

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. W. Staib

ZEITLICHE ENTWICKLUNG, INSULIN- UND
ACTINOMYCIN-D-BEEINFLUSSUNG DER AKUTEN
GLUCOCORTICOIDWIRKUNGEN AM ISOLIERT
PERFUNDIERTEN HINTERKÖRPER
ADRENALEKTOMIERTER RATTEN

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

WERNER STASCHOK

1 9 7 8



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533917_0087

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. W. Staib

ZEITLICHE ENTWICKLUNG, INSULIN- UND
ACTINOMYCIN-D-BEEINFLUSSUNG DER AKUTEN
GLUCOCORTICOIDWIRKUNGEN AM ISOLIERT
PERFUNDIERTEN HINTERKÖRPER
ADRENALEKTOMIERTER RATTEN

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin,

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

WERNER STASCHOK

1 9 7 8



Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Der Dekan der
Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez. Prof. Dr. H. Reinauer

Referent

gez. Prof. Dr. W. Staib

Korreferent

gez. Prof. Dr. H.-G. Solbach

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I.	<u>Einleitung</u>	3
II.	<u>Versuchsplanung</u>	6
III.	<u>Material und Methoden</u>	
	A) Versuchstiere	8
	B) Präparation der Versuchstiere	8
	C) Perfusionsmedium	11
	D) Perfusionssystem	12
	E) Reagentien	14
	F) Bestimmungsmethoden	15
	G) Berechnung und Auswertung	17
IV.	<u>Ergebnisse</u>	
	A) Versuchsgruppe I	
	a) Glucose	19
	b) Muskelglykogen	21
	c) Pyruvat	21
	d) Laktat	22
	e) Alanin	24
	f) Freies Glycerin, Freie Fettsäuren und Triglyceride	27
	g) Elektrolyte	29

B) Versuchsgruppe II

a) Glucose	30
b) Muskelglykogen	31
c) Pyruvat	32
d) Laktat	32
e) Alanin	34
f) Freies Glycerin, Freie Fettsäuren und Triglyceride	37
g) Elektrolyte	39

C) Versuchsgruppe II

a) Glucose	40
b) U - 14 C - Glucose Oxydation	41
c) Muskelglykogen	42
d) Pyruvat	43
e) Laktat	44
f) Alanin	45
g) Freies Glycerin, Freie Fettsäuren und Triglyceride	47
h) Elektrolyte	49

D) Kontrollparameter zur Beurteilung der Intaktheit des Muskelpräparates	50
---	----

V. Diskussion

A) Versuchsgruppe I	52
B) Versuchsgruppe II	60
C) Versuchsgruppe III	62

VI. <u>Zusammenfassung</u>	65
----------------------------	----

VII. <u>Danksagung</u>	66
------------------------	----

VIII. <u>Literaturverzeichnis</u>	67
-----------------------------------	----

EINLEITUNG

Zahlreiche Untersuchungen und zusammenfassende Übersichtsarbeiten der letzten Jahre zeigen die vielfältigen Aspekte der Wirkungsmechanismen und der primären Angriffspunkte der Glucocorticoide im Stoffwechsel des Gesamtorganismus (1-15,17) .

Mit dem Ziel, die subzellulären Ansatzpunkte der Glucocorticoide zu finden, konzentrierten sich in den sechziger Jahren die Forschungen auf die hepatische Wirkebene der Steroide (18-27). Einerseits wurden intrahepatische Enzyminduktion und intrahepatische Substratbereitstellung als wesentlichste Ursache für glucocorticoidbedingte Stoffwechselveränderungen postuliert (18-20), andererseits ergaben weitere Untersuchungen, daß neben diesen intrahepatischen Faktoren auch extrahepatische Glucocorticoidwirkungen ursächlich zum Gesamtbild der akuten Steroidwirkung beitragen (22, 26-28). So entwickelte sich das Bild zweier wesentlicher Angriffspunkte der Glucocorticoide, der intrahepatischen Enzyminduktion und der extrahepatischen Substratliberation. Wechselbeziehungen, Zusammenhänge im Metabolismus und Gewichtung dieser beiden Effekte für das Gesamtwirkungsbild sind heute noch Gegenstand intensiver Diskussion.

Im Rahmen der Untersuchung der einzelnen Stoffwechselbereiche kam dem Kohlenhydratmetabolismus eine zentrale Bedeutung zu. Die akute Glucoseanreicherung in den ersten Stunden nach Cortisolgabe wurde als eine periphere Glucoseutilisationshemmung und als Gluconeogenese sowohl bei in-vivo Versuchen (7,12,29) als auch durch

in-vitro Untersuchungen an peripheren Geweben (10, 30-38) nachgewiesen bzw als eine Glykogenakkumulation am Leberpräparat aufgezeigt (18-20,24,28). Über das Verhalten des Glucosemetabolismus nach Glucocorticoiden in der Skelettmuskulatur liegen unterschiedliche Ergebnisse und Deutungen vor, wobei letztlich ungeklärt blieb, ob und wenn ja, in welcher Weise die Steroide den Glucosetransport, die Glucoseutilisation, die Gluconeogenese primär oder sekundär in der Folge vorausgehender kataboler Prozesse beeinflussen (1,10-12, 39-43). Als wesentliches Element der Glucosehomöostase stellt die Gluconeogenese das verbindende Glied zwischen Kohlenhydratstoffwechsel und Proteinkatabolismus dar (44-48,64,65). Hier galt dem Stoffwechsel des nach Glucocorticoiden vom Muskel bevorzugt freigesetzten Alanins besondere Aufmerksamkeit bezüglich dessen Regulation, Produktion, Freisetzung und Verwertung (49-63).

Die Rolle des Fettstoffwechsels muß trotz zahlreicher Einzeldaten hinsichtlich der Beziehung zum Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel als nicht geklärt angesehen werden. Als ein Permissive-Effect der Glucocorticoide wird eine stimulierende Beeinflussung einer adrenalin-induzierten Lipolyse diskutiert (1,2,6,9,11,38,70,71, 76-79).

Neben substratbezogenen Untersuchungen galt auch der Modifizierung der Glucocorticoidwirkungen durch andere Hormone ein Interesse. Einflüsse und Wirkungen des Insulins auf den Stoffwechsel und die hormonelle Interaktion mit Glucocorticoiden stellten den Themenkreis weiterer Untersuchungen (24,67-75).

Der Skelettmuskulatur kommt aufgrund ihres Masseanteils am Gesamtorganismus und ihres damit quantitativ relevanten Anteils am Stoffwechselgeschehen eine wesentliche Bedeutung für die homöostatische Regulation des Organismus zu (32,40,47,80). Zur Untersuchung des Muskelmetabolismus dienten verschiedene Muskelpräparationen als Versuchsmodelle (40,50,58-61,64,66). Dabei erfuhr das Modell des isoliert perfundierten Hinterkörpers der Ratte zunehmend eine Bevorzugung (57,62,63,71,72,81,82), da es den in-vivo Verhältnissen sehr nahe kommt und von seiten des Stoffwechsels als quantitativ und qualitativ aussagekräftig anzusehen ist (32,82).

Da vorausgehende Arbeiten des Institutes Glucocorticoid-einflüsse auf Glucoseverhalten und Aminosäurenfreisetzung zeigten (32,58-61), sollte nun in Fortführung der Arbeiten in weiteren in-vitro Versuchen die zeitliche Entwicklung der Glucocorticoidwirkungen in der Muskulatur dargestellt werden.

Eine weitere Fragestellung galt der hormonellen Interaktion von Insulin und Glucocorticoiden in der Skelettmuskulatur.

Im Hinblick auf die Diskussion einer glucocorticoidbedingten Enzyminduktion als Ursache der peripheren Wirkungen sollte der Einfluß des Transskriptionsblockers Actinomycin-D auf den Stoffwechsel der Versuchstiere bzw. auf den Metabolismus des Hinterkörperpräparates untersucht werden.

II.

VERSUCHSPLANUNG

Als Versuchsmodell zur Durchführung der Untersuchungen verwendeten wir die Perfusion der isolierten Hinterkörper adrenalektomierter Ratten.

Die Versuchsdurchführung gliederte sich in drei Versuchsgruppen. Das Ziel mehrerer Versuchsreihen der ersten Gruppe lag in der Gewinnung von Parametern über die zeitliche Entwicklung der Glucocorticoidwirkungen in der Skelettmuskulatur. Einerseits wurde zur Ermittlung akuter Soforteffekte das synthetische Glucocorticoid Betamethason dem Perfusionsmedium zugesetzt, andererseits wurden zur Untersuchung einer Verzögerungsphase bis zum Wirkungseintritt adrenalektomierte Ratten eine, zwei und dreieinhalb Stunden vor Versuchsbeginn mit Betamethason vorbehandelt.

In einer zweiten Versuchsgruppe sollten die Einflüsse einer Insulingabe auf den Skelettmuskelmetabolismus sowie die Wechselbeziehungen zu Glucocorticoiden bestimmt werden. Entsprechend dieser Zielsetzung umfaßte diese Gruppe zwei Versuchsreihen, in denen adrenalektomierte bzw. adrenalektomierte und glucocorticoidvorbehandelte Versuchstiere unter Insulinzusatz perfundiert wurden.

In der letzten Versuchsgruppe schließlich untersuchten wir die Beeinflussung der Glucocorticoidwirkungen durch den Induktionshemmer Actinomycin-D. Dieser Fragestellung entsprach die Durchführung zweier Versuchsreihen, in denen die Einflüsse von Actinomycin-D zum einen an adrenalektomierten Tieren, zum anderen an adrenalektomierten und glucocorticoidvorbehandelten Ratten dargestellt wurden.

VERSUCHSPLANUNG

Vorbereitung der Versuchstiere					5-7 Tage vor Perfusionsbeginn bilaterale Adrenalectomie, Nahrungsentzug 24 Std vor Perfusionsbeginn, Trinkwasser: 0,9% ige NaCl-Lösung ad libitum				
Versuchsgruppe		I zeitliche Entwicklung		II Insulin-Einfluß		III Actinomycin-D-Einfluß			
V e r s u c h s r e e i h e	A	1 mg Betamethason/100 ml Medium 5 Min vor Perfusionsbeginn (N=6)		1 mU Insulin/ml Medium 15 Min vor Perfusions- beginn (N=6)		400 µg Actinomycin-D 4 Std vor Perfusions- beginn i.p. (N=6)			
	B	0,5 mg Betamethason/100 g Körpergewicht i.p. 1 Std vor Perfusionsbeginn (N=6)		1 mU Insulin/ml Medium 15 Min vor Perfusions- beginn 0,5 mg Betamethason / 100 g Körpergewicht 3,5 Std vor Perfusions- beginn i.p. 1 mg Betamethason / 100 ml Medium 5 Min vor Perfusions- beginn (N=8)		400 µg Actinomycin-D 4 Std vor Perfusions- beginn i.p. 0,5 mg Betamethason / 100 g Körpergewicht 3,5 Std vor Perfusions- beginn i.p. (N=6)			
	C	0,5 mg Betamethason/100 g Körpergewicht i.p. 2 Std vor Perfusionsbeginn (N=7)							
	D	0,5 mg Betamethason/100 g Körpergewicht i.p. 3,5 Std vor Perfusionsbeginn 1 mg Betamethason/100 ml Medium 5 Min vor Perfusionsbeginn (N=7)							

III. MATERIAL UND METHODEN

A) Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten ca 200 g schwere männliche Albinoratten des Stammes Wistar II (Inzuchtstamm : Tierhaus Universität Düsseldorf). 5-7 Tage vor Versuchsdurchführung wurden die Versuchstiere in Hexobarbitalnarkose von dorsal beidseitig adrenalectomiert. Die Ernährung der Tiere erfolgte mit einem Standardfutter (ALTROMIN 1314, Altromin GmbH, Lage). Nach Adrenalectomie erhielten die Tiere eine 0,9% ige NaCl-Lösung als Trinkwasser. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Versuchstieren die Nahrung entzogen, die NaCl-Lösung jedoch ad libitum belassen.

Bei Vorbehandlung mit Betamethason wurde den Versuchstieren eine, zwei, bzw. dreieinhalb Stunden vor Perfusionsbeginn eine Dosis von 0,5 mg Betamethason/100 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

Bei Actinomycin-D Vorbehandlung erfolgte vier Stunden vor Perfusionsbeginn eine intraperitoneale Injektion von 400 µg / pro Versuchstier.

B) Präparation der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden mit 0,02 g Evipan^R-Na/100 g Körpergewicht durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Anschließend erfolgte die Heparinisierung mit 0,2 ml Liquemin^R i.p. .

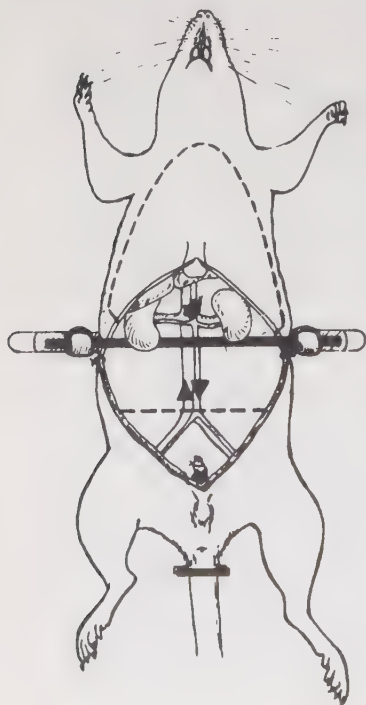
Der operativen Präparation der Tiere lag eine in früheren Arbeiten geschilderte Methodik zu Grunde (32,71, 81,). Nach Längsdurchtrennung der Bauchhaut erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle durch einen Medianschnitt von

der Symphyse bis zum Processus Xiphoideus. Die seitliche Bauchwand mit Haut und Muskulatur wurde in Höhe der unteren Nierenpole ligiert. Es folgte die Durchtrennung der Vasa Spermatica und der Ureteren. Die Evisceration des Beckens umfaßte das Unterbinden und Absetzen der Vesica Urinaria, der Testes, der Vesiculae Seminales und der Epididymides. Nach Unterbindung und Durchtrennung der Arteria Mesenterica Inferior wurde das Colon Descendens distal durchtrennt. Die Evisceration von Magen, Darm und Milz erfolgte durch Abbinden und Durchtrennen des Truncus Coeliacus, des Oesophagus, der Vena Portae, der Arteria und Vena Hepatica und des Ductus Choledochus. Die tiefen epigastrischen Gefäße und die Iliolumbalgefäße wurden unterbunden, vorhandenes sichtbares Fettgewebe entfernt. Eventuelle Sickerblutungen aus der durchtrennten Muskulatur der Bauchdecke wurden mit Hilfe eines Elektrocauters zum Stillstand gebracht. Unterhalb des Abganges der Nierenarterien wurden zur Vorbereitung der Kanülierung um Aorta und Vena Cava jeweils zwei lockere Ligaturen gelegt. Das anschließende Abheben der vorderen Thoraxwand erzeugte einen Pneumothorax. Danach wurden Aorta und Vena Cava jeweils durch Zuziehen der proximalen Schlinge unterbunden. Es folgte die Kanülierung der Aorta mit einer Braunüle^R 0,5 (B.Braun-Melsungen AG), anschließend die Kanülierung der Vena Cava mit einer Braunüle^R 1,0. Die Fixation der Kanülen erfolgte jeweils mittels der distal gelegten Schlinge. Das Versuchstier wurde nach Kanülierung der Aorta an ein Vorperfusionssystem mit 70 ml Medium angeschlossen, das nach einmaliger Passage verworfen wurde. Die ischämische Phase während der Kanülierung der großen Gefäße dauerte etwa zwei Minuten. Nun folgte die Abklemmung des Präparates in Höhe der unteren Nierenpole mit Hilfe einer Metallstange. Dies führte zu einer totalen Isolierung des Hinterkörpers

vom Oberkörper und verhinderte einen möglichen Verlust von Perfusionsmedium aus dem distalen Rattenkörper in den cranialen Teil. Mit Abklemmen des Schwanzes wurde die Präparation der Versuchstiere abgeschlossen. Die Gesamtoperationsdauer betrug 20 - 25 Minuten. Anschließend wurde das Präparat nach Ablauf der Vorperfusion in den Kreislauf des Hauptperfusionsystems eingeschaltet.

Abb.: 1

Das Modell des isolierten Hinterkörpers nach der Präparation



Die angedeuteten Pfeildreiecke bezeichnen Ein- und Ausflusspunkt des Mediums in die Aorta bzw aus der Vena Cava.

Unterhalb der Nierenpole ist die oben erwähnte Kompressionsstange dargestellt.

Distal der unterbrochenen Markierungslinie befindet sich das perfundierte Gewebe.

C) Perfusionsmedium

Für die Hinterkörperperfusion wurde ein semisynthetisches Perfusionsmedium verwendet, dessen Vorteil in einer genauen Kenntnis seiner Zusammensetzung lag.

Tab. 1

Zusammensetzung und Vorbereitungsart des semisynthetischen Mediums für Organperfusionen

BESTANDTEILE	KONZENTRATION	PRÄPARATE UND ART DER VORBEREITUNG
Krebs-Hinder-Bicarbonat-Puffer pH 7,38 (KRB = Puffer)	mVal / L K ⁺ 5,94 Na ⁺ 143,52 Ca ⁺⁺ 5,00 Mg ⁺⁺ 2,10 Cl ⁻ 130,70 H ₂ PO ₄ ⁻ 1,19 HCO ₃ ⁻ 24,76	15 minütige Begasung mit Carboeren (95 % O ₂ 5 % CO ₂)
Rindererythrocyten als Hämoglobinträger	10 g / 100 ml Hb Hämatokrit 28 %	1 - 2 Tage alte Rindererythrocyten : zweimal mit 0,9 % iger NaCl-Lösung, zweimal mit KRB - Puffer gewaschen
Rinderalbumin	4 g / 100 ml	Cohn - Fraktion V - Pentex / Miles : in KRB - Puffer gelöst = zweimal 24 Std gegen KRB - Puffer dialysiert
Heparin	5000 USPE / 100 ml	Liquemin 5000 Hoffmann - La Roche
D - (+) - Glucose	11 mM	m-D-Glucose p.A. - Serva 22700
Pyruvat - Na	0,15 mM	Merck 6619
L - (+) - Lactat	0,7 - 1,5 mM	aus den Erythrocyten

Nach Einbringen des Perfusionsmediums in das Perfusionssystem zeigte sich ein pH-Wert von etwa 7,13. In einer Vorzirkulationsphase des Mediums von 30 Minuten wurde der pH-Wert durch Zusatz von Natriumhydrogencarbonat auf pH 7,40 $\pm$ 0,04 eingestellt.

In den Versuchsreihen, in denen ein Glucocorticoidzusatz zum Medium vorgesehen war, wurde dem o.a. Standardmedium 1 mg Betamethason / 100 ml Medium 5 Minuten vor Perfusionsbeginn zugesetzt.

Bei Insulinzusatz zum Medium wurde 15 Minuten vor Perfusionsbeginn 1 mU Insulin / ml Medium hinzugefügt.

Der Pyruvatzusatz zum Ansatz des Mediums war erforderlich, um den Ausgangswert des Laktat-Pyruvat-Quotienten wegen des infolge Glykolyse gebildeten Erythrocytenlaktates auf einen Wert von etwa 10 einzustellen.

Wegen der Kürze der Perfusionszeit konnte auf einen Antibiotikaschutz verzichtet werden.

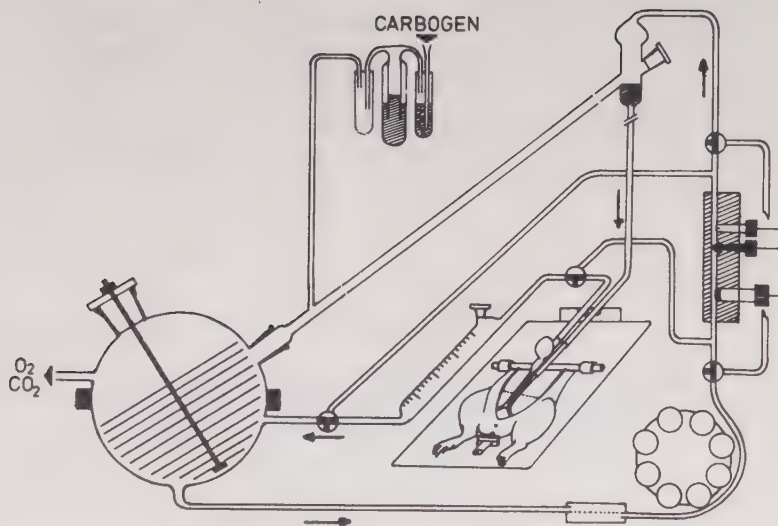
D) Perfusionssystem

Die Perfusionsapparatur stellte ein Rezirkulationssystem dar, das bereits in früheren Untersuchungen des Institutes Verwendung fand (32,63).

Das System befand sich in einer Perfusionskammer, die die Erhaltung einer konstanten Temperatur von 37°C erlaubte. Die rezirkulierenden 100 ml Perfusionsmedium wurden in einem Scheibenoxxygenator mit angefeuchtetem Carbogen (95 Vol % O_2 / 5 Vol % CO_2) begast. Nach einer Filterpassage gelangte das Medium mit Hilfe einer Rollenpumpe in ein Überlaufgefäß, wobei es eine Durchflußelektrode durchströmte. Infolge konstanter Einstellung des Überlaufspiegels war ein kontinuierliches Einströmen des Mediums in die Aorta des Versuchspräparates mit einem hydrostatischen Druck von etwa 80 mm Hg gewährleistet. Mittels eines graduierten Röhrchens erfolgte nach Rücklauf des Mediums aus der Vena Cava die diskontinuierliche Messung der Durchflußrate. Mit Rückfluß des Mediums in den Oxygenator war das Kreislaufsystem geschlossen.

Abb.: 2

Das Perfusionssystem

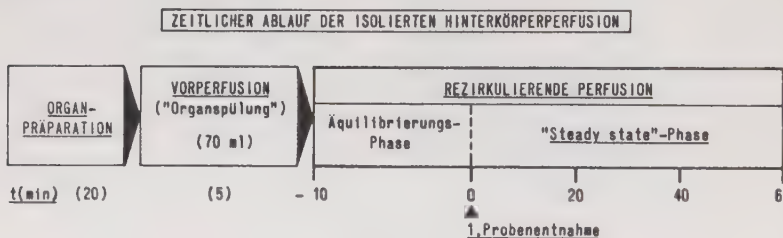


Die Flußrichtung des Mediums ist durch Pfeile gekennzeichnet. In der Abbildung links unten ist der Scheibenoxxygenator dargestellt. Rechts unten ist die Rollpumpe, darüber die Durchflußelektrode, im weiteren Verlauf das Oberlaufgefäß abgebildet. In der Bildmitte findet sich die Darstellung des Versuchspräparates mit Rücklauf zum Oxygenator und Durchflußmeßröhrchen. Am oberen Bildrand ist das Carbogenbegasungssystem mit Zulauf zum Scheibenoxxygenator dargestellt.

Die oben erwähnte Durchflußelektrode (acid base digital analyzer PHM 72, Radiometer Kopenhagen) erlaubte während der Perfusion Kontrolle und Bestimmung des pH-Wertes sowie des O_2 - Partialdruckes.

Nach Einschaltung des Versuchspräparates in den Mediumkreislauf begann der Perfusionsablauf mit einer Äquilibrierungsphase zur postoperativen Wiederherstellung des Stoffwechselgleichgewichtes. Diese Reaktivierungsphase umfaßte 10 Minuten und endete mit der ersten Probenentnahme (= 0-Perfusionszeit). Es folgten drei weitere Probenentnahmen aus dem Oberlaufgefäß bei 20', 40' und 60'. Der Mediumdurchfluß von etwa 10-16 ml/min wurde bei -10', 0', 20', 40' und 60' mittels des Durchflußmeßröhrchens bestimmt.

Abb.: 3



E) Reagentien

- a) Als synthetisches Glucocorticoid wurde das Dinatriumsalz des Betamethason verwendet (9a Fluor-11 β , 16 β -methyl-1 prednisolon). Betamethason, CELESTAN^R soluble der Firma Byk Essex, München.
- b) Insulin LEO^R Normalinsulin der Firma Hormon-Chemie, München, 40 IE / ml
Am Versuchstage erfolgte eine Verdünnung mit 0,9% iger NaCl-Lösung auf 100 mU/ml Insulinlösung.
- c) Actinomycin-D, SERVACTINOMYCIN^R 10711, 98% reines Actinomycin-D + 16 mg Mannit (=400 μ g) gelöst in 1 ml kalter, CO₂ angereicherter NaCl-Lösung.

- d) Hexobarbital EVIPAN^R - Na, Bayer AG, Leverkusen
- e) LIQUEMIN^R, Hoffmann La Roche, 1 ml = 5000 IE
- f) U-¹⁴C-Glucose 230 mCi/mmol, Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig
- g) DIMILUME^R, Scintillationsgemisch, Packard Instruments Comp.Inc.

F) Bestimmungsmethoden

a) Glucose

Die aus dem Medium entnommenen Proben wurden mit 0,33 N Perchlorsäure enteiweißt. Im Oberstand wurde Glucose mit der Glucoseoxydase-Methode (GOD-Perid, Testkombination 15756, Boehringer GmbH, Mannheim) nach WERNER et al. (94) bestimmt.

b) Pyruvat

Nach Deproteinisierung der entnommenen Proben mit 1 N Perchlorsäure erfolgte die Bestimmung des Pyruvats im Oberstand mit LDH (Testkombination 15973, Boehringer GmbH, Mannheim) nach CZOK & LAMPRECHT (95).

c) Laktat

Die Laktatkonzentration wurde durch Deproteinisierung mit 0,6 N Perchlorsäure mit LDH nach WAHLEFELD & GUT-MANN (96) ermittelt.

d) Alanin

Die Alaninbestimmung wurde nach Deproteinisierung mit 0,6 N Perchlorsäure mit Alanindehydrogenase (L-Alanin-Dehydrogenase aus Bacillus subtilis, 150 IE/ml,

Nr 15224, Boehringer GmbH, Mannheim) nach der Methode von WILLIAMSON (97) durchgeführt.

e) Muskelglykogen

Nach Ablauf der Perfusion wurde im Frierstoppverfahren eine Gewebeprobe aus dem Musculus Gastrocnemius entnommen. Die Isolierung des Glykogens erfolgte mit 0,3 g LiCl/100 ml Äthanol. Nach SEIFTER et al. (98) wurde der Muskelglykogengehalt mittels der Anthronmethode bestimmt.

f) Freie Fettsäuren

Die Freien Fettsäuren im Serum wurden nach DUNCOMBE (99) mit der Testkombination 15997, Boehringer GmbH, Mannheim, ermittelt, nachdem zuvor die Kupfersalze der Freien Fettsäuren gebildet worden waren.

g) Freies Glycerin und Triglyceride

Nach alkalischer Verseifung erfolgte die Bestimmung des Freien Glycerins und der Triglyceride enzymatisch nach EGGSTEIN & KUHLMANN (100) mittels der Testkombination Nr. 15989, Boehringer GmbH, Mannheim.

h) $^{14}\text{CO}_2$

In den Versuchen der Gruppe III (Actinomycin-D) wurde die Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ aus radioaktiv markierter Glucose gemessen. 1 ml = 20 μCi U- ^{14}C -Glucose wurde dem Medium zum Zeitpunkt - 5Min zugesetzt. Das entstehende $^{14}\text{CO}_2$ wurde mit Äthylenglycolmonomethyläther / Äthanolamin (2:1) absorbiert. Hierzu wurde bei 0°, 20°, 40° und 60° jeweils 10 ml Absorptionsgemisch frisch in das Absorptionsgefäß eingebracht.

Nach Zugabe von 2 ml der gewonnenen Probe zu je 10 ml Scintillationsgemisch (DIMILUME^R) wurde die Radioaktivität in einem Tricarb^R gezählt. (Tricarb^R Modell 3380, liquid scintillation spectrometer, Packard Instruments Comp. Inc.)

i) Elektrolyte

Die Elektrolytkonzentrationen im Serum (K^+ , Na^+ , Ca^{++}) wurden mit Hilfe eines Flammenphotometers (Eppendorf) gemessen.

G) Berechnung und Auswertung

Während des Perfusionsverlaufes wurden bei 0, 20, 40' und 60' jeweils 5 ml Perfusionsmedium entnommen. Nach Bestimmung der Substratmenge in dem vorhandenen Perfusat zu den Entnahmezeitpunkten erfolgte die Berechnung der Substratproduktionen bzw. Substrataufnahmen unter Berücksichtigung der entnommenen Probenmenge. Die Differenzen in Produktion und Aufnahme zwischen den Entnahmezeitpunkten wurden zu Kummulativen addiert. Es folgte die Umrechnung der Werte auf 30 g Muskulatur (32,81). Die Auswertung der Ergebnisse wurde dem t-Test (Student-Test) folgend vorgenommen. Als Signifikanzgrenze galt $2 p < 0,05$ (101). Die Werte in Tabellen und Abbildungen sind in $\bar{x} \pm s_{EM}$ angegeben.

Der Eigenstoffwechsel des erythrocytenhaltigen Mediums wurde in den Darstellungen nicht berücksichtigt.

Tab.: 1

Glykolytische Aktivität der Erythrocyten im Perfusionsmedium, ermittelt in Leerperfusionen

(Werte sind angegeben als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

	N=	$\mu\text{Mol} / \text{min} \times 100 \text{ ml Perfusat}$
Glucose	55	- 0,233 $\pm$ 0,089
Pyruvat	55	- 0,044 $\pm$ 0,007
Laktat	55	- 0,519 $\pm$ 0,052

In vorausgehenden Untersuchungen des Instituts (32) wurden bei Perfusionen adrenaletomierter, nicht vorbehandelter Versuchstiere Stoffwechselfparameter als Normalwerte ermittelt. Bei Durchführung der jetzigen Versuchsreihen mit Zusätzen zum Medium, jedoch ohne Vorbehandlung der adrenaletomierten Tiere galten diese o.a. Normalwerte als Bezugsgrößen.

IV. ERGEBNISSE

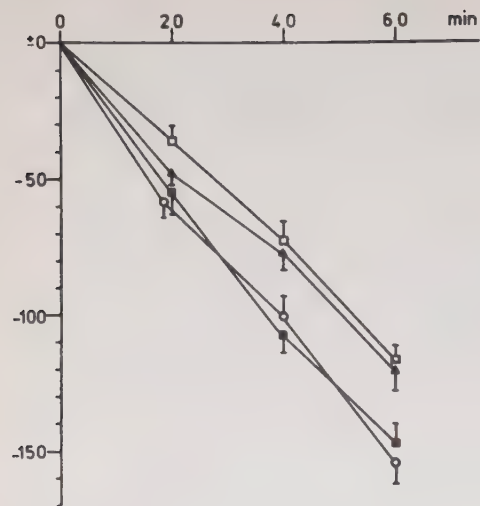
A) VERSUCHSGRUPPE I (zeitliche Entwicklung)

a) Glucose

Die Glucosekonzentration im Ansatz des Perfusionsmediums betrug $11 \mu\text{Mol/ml}$. Zu Beginn der sechzigminütigen Perfusion fand sich ein Ausgangsspiegel der Glucosekonzentration von im Mittel $10 \mu\text{Mol/ml}$. Diese Differenz erklärte sich durch eine Glucoseutilisation in der Äquilibrierungsphase, durch eine Verteilung auf den Extrazellulärraum sowie durch eine erythrocytenbedingte Glykolyse. Im Laufe der Perfusion wurde ein linearer Anstieg der Glucoseaufnahme aus dem Medium verzeichnet (Abb.:I.1). Ein Betamethasonzusatz zum Perfusionsmedium sowie eine einstündige Vorbehandlung der Versuchstiere bewirkten keine Veränderung der Glucoseaufnahme gegenüber adrenaletomierten Kontrolltieren. Eine zweistündige Vorbehandlung mit Glucocorticoiden führte zu einer signifikanten Hemmung der Glucoseaufnahme. Eine dreieinhalbstündige in-vivo-Betamethasonvorbehandlung mit gleichzeitigem Betamethasonzusatz zum Medium steigerte diesen Effekt der verminderten Glucoseaufnahme nicht weiter (Tab.:I.1, Abb.: I.1, I.2).

Abb.: I.1

Glucoseaufnahme aus dem Medium



$\mu\text{Mol Glucose}$
30 g Muskel

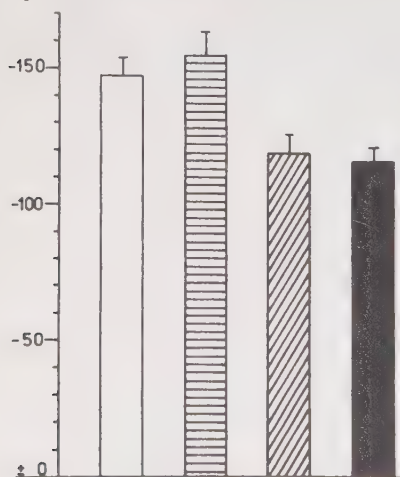
- Betamethasonzusatz
- Betamethasonvorbehandlung 1 h
- ▲ Betamethasonvorbehandlung 2 h
- Betamethasonvorbehandlung 3,5 h und Betamethasonzusatz

Signifikanz: 1h/2h $p < 0,01$
(60' - Kumulative)

Abb.: I.2

60' - Kumulative der Glucoseaufnahme durch das Muskelpräparat

$\mu\text{Mol Glucose}$
30 g Muskel · h



Signifikanz: 1h/2h $p < 0,01$

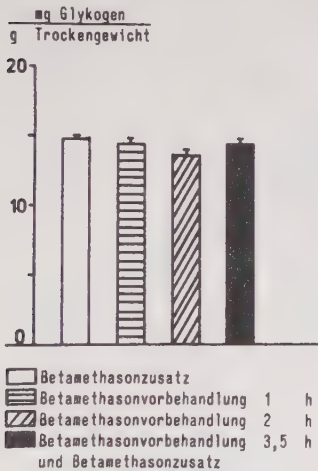
- Betamethasonzusatz
- ▨ Betamethasonvorbehandlung 1 h
- ▧ Betamethasonvorbehandlung 2 h
- Betamethasonvorbehandlung 3,5 h und Betamethasonzusatz

b) Muskelglykogen

Im Glykogengehalt des Musculus Gastrocnemius war in dieser Versuchsgruppe keine signifikante Änderung nach Betamethason festzustellen. (Tab.: I.1, Abb.: I.3)

Abb.: I.3

Muskelglykogengehalt des Musculus Gastrocnemius



Signifikanz:

o/1h/2h/3,5h n.s.

(o=Betamethasonzusatz)

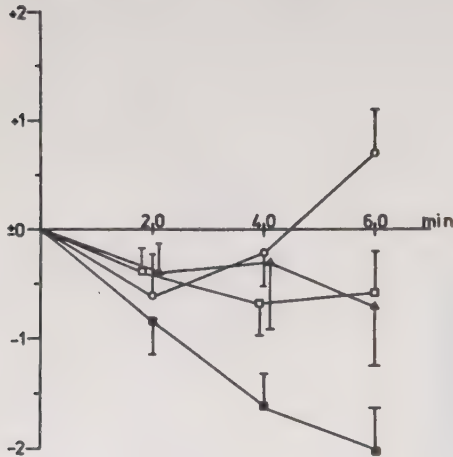
c) Pyruvat

Zu Beginn der Perfusion wurde eine Pyruvatausgangskonzentration von im Mittel $0,15 \mu\text{Mol/ml}$ gemessen. Dieser Wert entsprach der Konzentration, die durch Zusatz von Pyruvat zum Ansatz des Perfusionsmediums erreicht wurde. Bei in-vivo-Betamethasonvorbehandlung zeigte sich nach anfänglicher Pyruvataufnahme ($20'$ -Wert) eine Pyruvat-abgabe durch das Muskelpräparat bzw eine gegenüber nichtvorbehandelten Tieren verringerte Pyruvataufnahme aus dem Medium ($60'$ -Kumulative). (Tab.: I.1, Abb.: I.4)

Abb.: I.4

Pyruvatverhalten

$\mu\text{Mol Pyruvat}$
30 g Muskel



Signifikanz:

(60° - Kumulative)

0/1h $p < 0,001$

1h/2h/3,5h n.s.

- Betamethasonzusatz
- Betamethasonvorbehandlung 1 h
- ▲ Betamethasonvorbehandlung 2 h
- Betamethasonvorbehandlung 3,5 h und Betamethasonzusatz

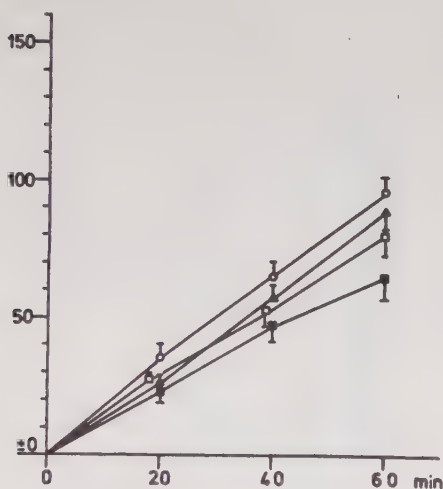
d) Laktat

Nach einstündiger Glucocorticoidvorbehandlung erfuhr die Laktatbildung eine geringe signifikante Steigerung gegenüber nicht vorbehandelten Kontrolltieren. Nach zwei und dreieinhalbstündiger Vorbehandlung war ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Reihen A,C und D nicht festzustellen (Tab.: I.1, Abb.: I.5). Der Laktat-Pyruvat-Quotient zeigte dementsprechend nach zwei und dreieinhalbstündiger Vorbehandlung eine Erniedrigung (60°) (Tab.: I.2).

Abb.: I.5

Laktatfreisetzung durch das Muskelpräparat

$\mu\text{Mol Lactat}$
30 g Muskel



Signifikanz:

(60' - Kumulative)

o/1h $p < 0,05$

o/2h/3,5h n.s.

- Betamethasonzusatz
- Betamethasonvorbehandlung 1 h
- ▲ Betamethasonvorbehandlung 2 h
- Betamethasonvorbehandlung 3,5 h
- und Betamethasonzusatz

Tab.: I.2

Laktat-Pyruvat-Quotienten der Versuchsgruppe I

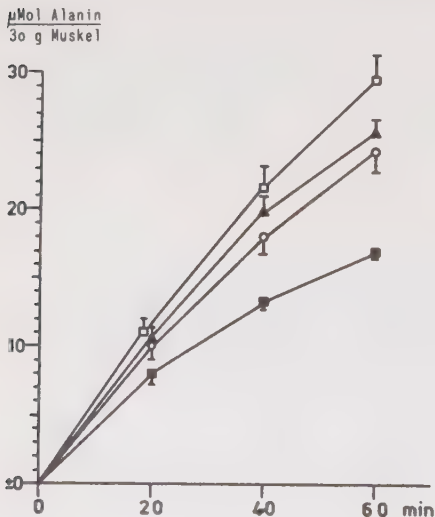
Reihe	N	0'	20'	40'	60'
A	6	9,70 ± 0,46	12,78 ± 1,11	15,80 ± 1,29	19,81 ± 2,08
B	6	9,89 ± 0,95	12,80 ± 1,08	15,76 ± 0,80	20,11 ± 1,83
C	7	9,75 ± 1,22	12,70 ± 0,77	14,67 ± 1,05	16,05 ± 1,11
D	7	8,65 ± 0,49	11,50 ± 0,81	12,16 ± 2,29	16,46 ± 0,99
Signifikanz:		60' B/C n.s.		60' B/D n.s.	

e) Alanin

Der Ausgangswert der Alaninkonzentration bei Perfusionsbeginn betrug im Mittel $0,100 \mu\text{Mol/ml}$. Im Verlauf der Perfusion war ein nahezu linearer Anstieg der Alaninfreisetzung zu verzeichnen. Wurde dem Perfusionsmedium in der ersten Versuchsreihe Betamethason zugesetzt, zeigte sich kein Anstieg der Alaninfreisetzung gegenüber adrenalectomierten Kontrolltieren (32). Jedoch führte bereits eine einstündige Betamethasonvorbehandlung zu einer hochsignifikanten Steigerung der Alaninproduktion der Muskulatur (+ 42,6 %). Durch eine zwei und dreieinhalbstündige Vorbehandlung wurde eine weitere, jedoch nicht signifikante Steigerung der Alaninfreisetzung erreicht (Tab.: I.1, Abb.: I.6, I.7)

Abb.: I.6

Alaninproduktion durch das Muskelpräparat



Signifikanz:

(60' - Kumulative)

0/1h $p < 0,001$

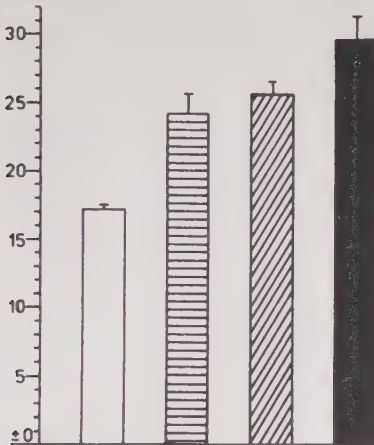
1h/2h/3,5h $p > 0,05$ n.s.

- Betamethasonzusatz
 - Betamethasonvorbehandlung 1 h
 - ▲ Betamethasonvorbehandlung 2 h
 - Betamethasonvorbehandlung 3,5 h
- und Betamethasonzusatz

Abb.: I.7

60' - Kumulative der Alaninproduktion

$\frac{\mu\text{Mol Alanin}}{30 \text{ g Muskel} \cdot \text{h}}$



□ Betamethasonzusatz
▨ Betamethasonvorbehandlung 1 h
▧ Betamethasonvorbehandlung 2 h
■ Betamethasonvorbehandlung 3,5 h
und Betamethasonzusatz

Signifikanz:

0/1h $p < 0,001$

1h/2h/3,5h n.s.

Tab.: 1.1

VERSUCHSREIHE	N	S U B S T R A T E				
		Glucose	Pyruvat	Laktat	Alanin	Muskel- glykogen
A Betamethason- zusatz	6	- 147,66 + 6,62 -	- 2,06 + 0,38 -	+ 64,89 + 8,30 -	+ 17,02 + 0,25 -	14,81 + 0,23 -
B Betamethason- vorbehandlung 1 h	6	- 153,50 + 8,55 -	+ 0,71 +) + 0,42 -	+ 95,93 +) + 5,98 -	+ 24,28 +) + 1,46 -	14,47 + 0,45 -
C Betamethason- vorbehandlung 2 h	7	- 119,07 +) + 7,41 -	- 0,74 + 0,59 -	+ 89,48 + 6,63 -	+ 25,60 + 0,97 -	13,60 + 0,38 -
D Betamethason- vorbehandlung 3,5 h und Betamethason- zusatz	7	- 116,77 + 5,43 -	- 0,58 + 0,45 -	+ 80,01 + 7,42 -	+ 29,72 + 1,79 -	14,48 + 0,41 -
P		+) < 0,01	+) < 0,001	+) < 0,05	+) < 0,001	

Glucose, Pyruvat, Laktat, Alanin angegeben in $\mu\text{Mol} \times (30 \text{ g Muskel} \times \text{h})^{-1}$
Muskelglykogen angegeben in $\text{mg} / \text{g Trockengewicht}$
Ergebnisse angegeben als $\bar{x} \pm s_{EM}$

f) Freies Glycerin, Freie Fettsäuren, Triglyceride

Betamethasonvorbehandlung und -zusatz führten zu keinen signifikanten Veränderungen in der Produktion von Freiem Glycerin und Freien Fettsäuren (Tab.: I.3, Abb.: I.8, I.9). Die Serumspiegel der Triglyceride wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Tab.:I.3).

Tab.: I.3

Freies Glycerin, Freie Fettsäuren und Triglyceride der Versuchsreihen I.A und I.D

	I.A (N=6)	I.D (N=7)	
Freies Glycerin	+ 3,66 _± 0,75	+ 4,73 _± 1,50	n.s.
Freie Fettsäuren	+16,16 _± 2,41	+21,69 _± 4,03	n.s.
Triglycerid-Glyc			
0 ⁻	0,025 _± 0,007	0,027 _± 0,007	n.s.
20 ⁻	0,043 _± 0,008	0,032 _± 0,013	n.s.
40 ⁻	0,026 _± 0,005	0,029 _± 0,014	n.s.
60 ⁻	0,039 _± 0,014	0,052 _± 0,015	n.s.

Freie Fettsäuren sind angegeben in $\mu\text{Val} \times (30 \text{ g Muskel} \times \text{h})^{-1}$

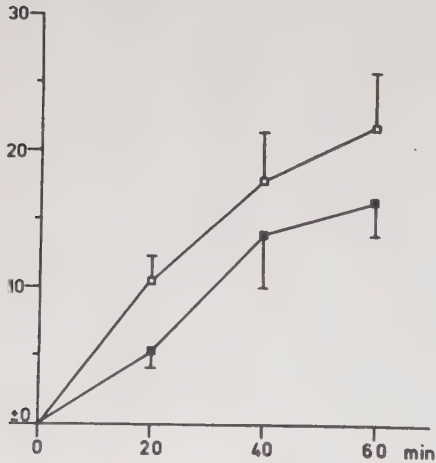
Freies Glycerin ist angegeben in $\mu\text{Mol} \times (30 \text{ g Muskel} \times \text{h})^{-1}$

Triglycerid-Serumspiegel sind angegeben in $\mu\text{Mol} / \text{ml}$

Abb.: I.8

Produktion der Freien Fettsäuren in den
Versuchsreihen I.A und I.D

$\mu\text{Val Freie Fettsäuren}$
30 g Muskel



■ Betamethason-
zusatz = I.A

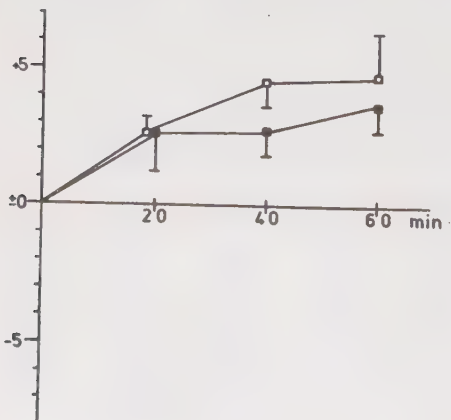
□ Betamethason-
vorbehandlung
3,5 h und
Betamethason-
zusatz = I.D

Signifikanz:
I.A / I.D n.s.

Abb.: I.9

Freisetzung von Freiem Glycerin in den
Versuchsreihen I.A und I.D

$\mu\text{Mol Freies Glycerin}$
30 g Muskel



■ Betamethason-
zusatz = I.A

□ Betamethason-
vorbehandlung
3,5 h und
Betamethason-
zusatz = I.D

Signifikanz:
I.A / I.D n.s.

g) Elektrolyte

Während die Serumkonzentrationen von Na^+ und Ca^{++} im Verlauf der Perfusion konstant blieben, kam es zu einem geringen K^+ - Ausstrom ins Medium, der etwa einen 9 % igen Anstieg der Ausgangskonzentration bewirkte (Tab.: I.4). An diesem K^+ - Verhalten dürften ursächlich eine während der Perfusion auftretende Hämolyse, weiterhin Zellschäden in den Grenzbezirken der Perfusion, wie auch die Insulinarmut des Präparates beteiligt sein.

Tab.: I.4

Das Elektrolytverhalten im Serum in den Versuchsreihen I.A und I.D (Betamethasonzusatz / Betamethasonvorbehandlung 3,5 h und Betamethasonzusatz)

	Na^+	K^+	Ca^{++}
I.A (N=6)			
o'	140,6 ± 7,50	5,40 ± 0,27	6,00 ± 0,21
60'	150,0 ± 2,07	5,92 ± 0,20	6,02 ± 0,18
I.D (N=7)			
o'	149,8 ± 1,39	5,60 ± 0,06	6,17 ± 0,25
60'	146,5 ± 4,45	5,70 ± 0,20	5,94 ± 0,21

Konzentrationsangabe in mVal / Ltr Mediumplasma

Signifikanz: I.A K^+ o' / 60' n.s.
 Na^+ o' / 60' n.s.

B) VERSUCHSGRUPPE II (Insulineinfluß)

a) Glucose

Wurde dem Perfusionsmedium Insulin (1 mU/ml Medium) zugesetzt, so ließ sich ein zweieinhalbfacher Anstieg der Glucoseaufnahme gegenüber adrenalektomierten, insulinfrei perfundierten Tieren beobachten (siehe Ergebnisse der Reihe I.A). Dieser Insulineffekt auf das Muskelpräparat konnte durch eine dreieinhalbstündige Betamethasonvorbehandlung mit Betamethasonzusatz zum Medium nicht vermindert werden (Tab.:II.1, Abb.: II.1, II.2).

Abb.: II.1

Glucoseaufnahme aus dem Medium durch das Muskelpräparat

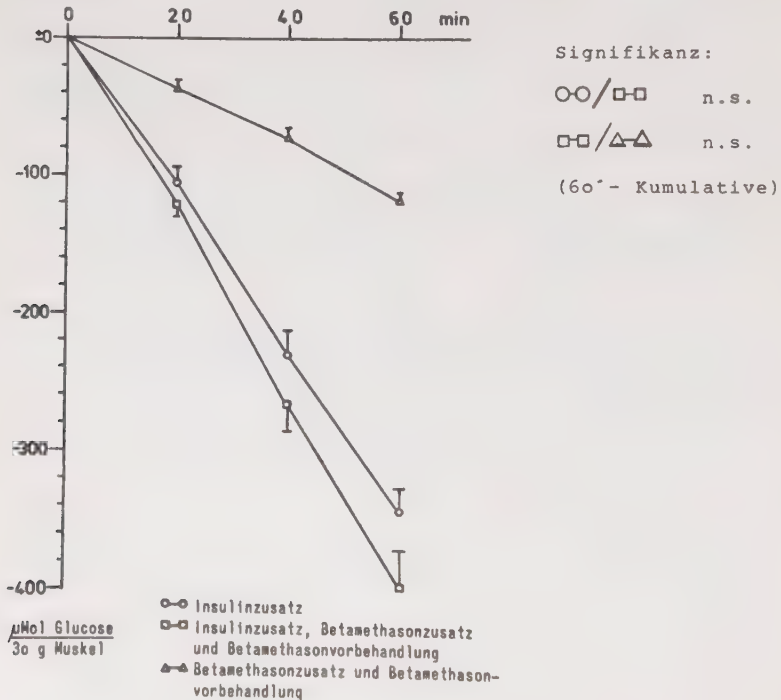
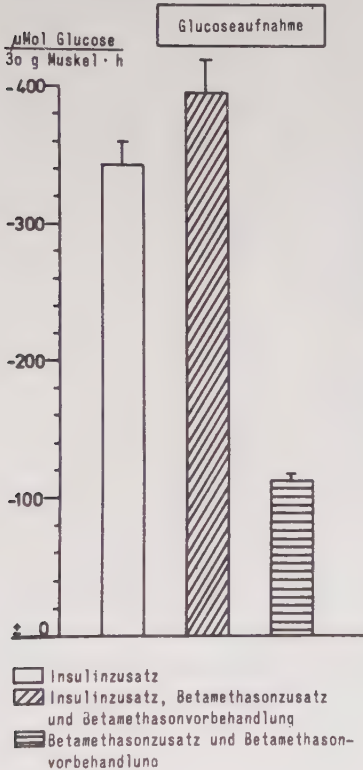


Abb.: II.2

60'- Kumulative der Glucoseaufnahme durch das Muskelpräparat



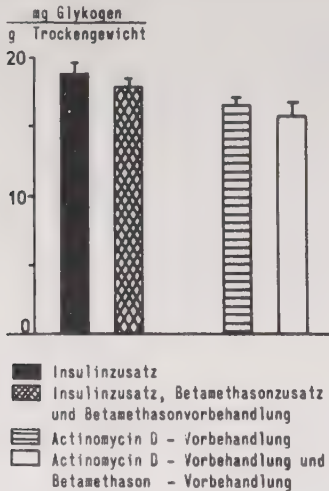
Signifikanz:
siehe Abb.: II.1

b) Muskelglykogen

Insulinzusatz zum Perfusionsmedium bewirkte in beiden Versuchsreihen einen mehr als 30 % igen Anstieg des Glykogengehaltes in der Muskulatur gegenüber insulinfrei perfundierten Präparaten (Tab.: II.1, Abb.: II.3).

Abb.: II.3

Muskelglykogengehalt des Musculus Gastrocnemius



Signifikanz:

I.A / II.A $p < 0,001$

I.D / II.B $p < 0,005$

II.A / II.B $p > 0,05$ n.s.

c) Pyruvat

Unter Insulingabe kam es zu einer Produktion von Pyruvat. Diese Pyruvatabgabe ans Medium zeigte nach Glucocorticoidgabe ab zwanzig Minuten Perfusionszeit einen geringen, jedoch nicht signifikanten Anstieg (Tab.: II.1, Abb.: II.4) .

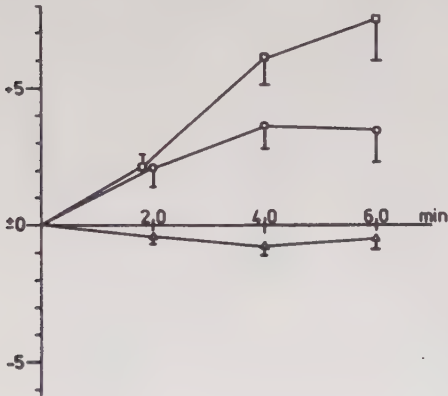
d) Laktat

Bei einer Glucoseaufnahmesteigerung um den Faktor 2,5 erfuhr die Laktatproduktion insulinbedingt eine Steigerung um den Faktor 1,7 gegenüber insulinfreien Perfusionen in der Versuchsreihe I.A . Die Betamethasongabe bewirkte keine Änderung im Verlauf der Laktatfreisetzung gegenüber der Insulinkontrollreihe II.A (Tab.: II.1, Abb.: II.5) .

Abb.: II.4

Pyruvatfreisetzung unter Insulineinfluß

$\mu\text{Mol Pyruvat}$
30 g Muskel



Signifikanz:

(60' - Kumulative)

○-○ / □-□ n.s.

I.A / II.A $p < 0,001$

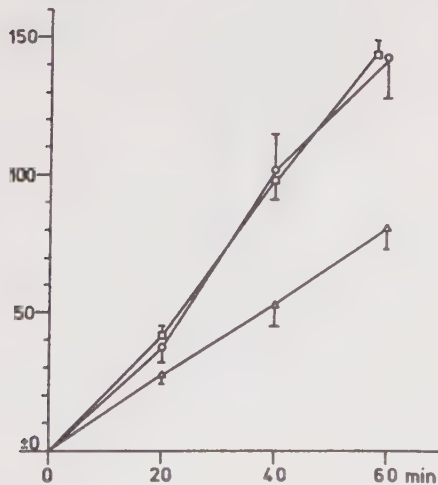
□-□ / △-△ $p < 0,05$

○-○ Insulinzusatz
□-□ Insulinzusatz, Betamethasonzusatz und Betamethasonvorbehandlung
△-△ Betamethasonzusatz und Betamethasonvorbehandlung

Abb.: II.5

Laktatfreisetzung

$\mu\text{Mol Lactat}$
30 g Muskel



Signifikanz:

(60' - Kumulative)

○-○ / □-□ n.s.

I.A / II.A $p < 0,001$

□-□ / △-△ $p < 0,001$

○-○ Insulinzusatz
□-□ Insulinzusatz, Betamethasonzusatz und Betamethasonvorbehandlung
△-△ Betamethasonzusatz und Betamethasonvorbehandlung

e) Alanin

Insulingabe, Betamethasonvorbehandlung und -zusatz führten zu einer mittleren Freisetzungsrates des Alanins von $24,72 \pm 2,17 \mu\text{Mol}$ (60' - Kumulativ). Dieser Wert steht einerseits einer Alaninproduktion von $16,14 \pm 0,56 \mu\text{Mol}$ bei alleinigem Insulinzusatz gegenüber, andererseits einer Alaninfreisetzung von $29,72 \pm 1,79 \mu\text{Mol}$ bei Betamethasonvorbehandlung und -zusatz (Reihe I.D). Alleiniger Insulinzusatz in der Versuchsreihe II.A bewirkte eine geringe, jedoch nicht signifikante Abnahme der Alaninfreisetzung gegenüber insulinfrei perfundierten Präparaten der Reihe I.A. Die Erklärung für diese nur geringe Abnahme liegt darin, daß Adrenalectomie bereits zu einer Verminderung der Alaninfreisetzung ($18,78 \pm 0,46 \mu\text{Mol}$) gegenüber Normaltieren ($22,05 \pm 0,87 \mu\text{Mol}$) führt.

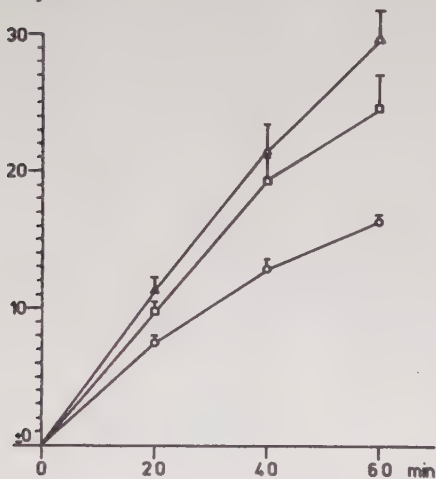
Nach Betamethason steigt die Alaninfreisetzung zwar signifikant gegenüber den Werten der Reihe II.A (nur Insulinzusatz) an, erreicht jedoch nicht die hohen Werte der Versuchsreihe I.D (Betamethasonvorbehandlung ohne Insulinzusatz).

(Tab.: II.1, Abb.: II.6, II.7)

Abb.: II.6

Alaninfreisetzung durch den Muskel

$\frac{\mu\text{Mol Alanin}}{30 \text{ g Muskel}}$



Signifikanz:
(60' - Kumulative)

○-○ / □-□ $p < 0,01$

□-□ / △-△ n.s.

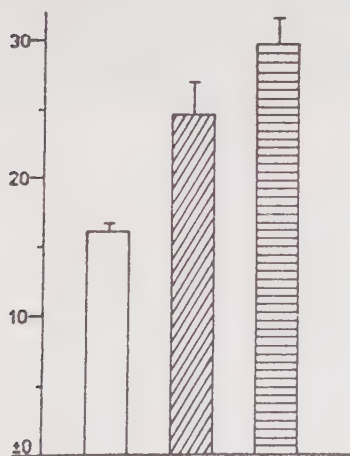
I.A / II.A n.s.

○-○ Insulinzusatz
□-□ Insulinzusatz, Betamethasonzusatz und Betamethasonvorbehandlung
△-△ Betamethasonzusatz und Betamethasonvorbehandlung

Abb.: II.7

60' - Kumulative der Alaninfreisetzung

$\frac{\mu\text{Mol Alanin}}{30 \text{ g Muskel} \cdot \text{h}}$



Signifikanz:
(siehe Abb.: II.6)

□ Insulinzusatz
▨ Insulinzusatz, Betamethasonzusatz und Betamethasonvorbehandlung
▤ Betamethasonzusatz und Betamethasonvorbehandlung

Tab.: II.1

VERSUCHSREIHE	S U B S T R A T E				
	N	Glucose	Pyruvat	Laktat	Alanin
A Insulin- zusatz	6	- 343,37 + 16,76 -	+ 3,35 + 1,29 -	+ 141,74 + 14,15 -	+ 16,14 + 0,56 -
B Insulin- zusatz Betametha- sonzusatz Betametha- sonvorbe- handlung 3,5 h	8	- 397,11 + 24,15 -	+ 7,49 + 1,59 -	+ 143,87 + 4,03 -	+ 24,73 + 2,17 -
p		n.s.	n.s.	n.s.	0,01
					n.s.

Glucose, Pyruvat, Laktat, Alanin sind angegeben in $\mu\text{Mol} \times (30 \text{ g Muskel} \times \text{h})^{-1}$
Muskelglykogen ist angegeben in $\text{mg} / \text{g Trockengewicht}$
Ergebnisse sind angegeben als $\bar{x} \pm s_{EM}$

f) Freies Glycerin, Freie Fettsäuren, Triglyceride

Insulinzusatz, ließ die Abgabe von Freien Fettsäuren durch das Muskelpräparat signifikant absinken. Dieser Effekt erfuhr keine Beeinflussung durch Betamethason. Bei alleiniger Insulingabe zeigte sich keine Freisetzung von Freiem Glycerin, während der letzten vierzig Perfusionsminuten wurde eine geringe Aufnahme von Freiem Glycerin festgestellt. Unter Insulin und zusätzlicher Betamethasonvorbehandlung wurde eine Freisetzung von Freiem Glycerin gemessen, die jedoch gegenüber insulinfrei perfundierten Präparaten eine Tendenz der verminderten Abgabe zeigte (Tab.: II.2, Abb.: II,8 II.9). Die Serum-Triglyceridspiegel blieben unverändert.

Tab.: II.2

Verhalten von Freiem Glycerin, Freisetzung von Freien Fettsäuren und Triglyceridserumspiegel der Versuchsserien II.A (alleiniger Insulinzusatz) und II.B (Insulinzusatz und Betamethasonvorbehandlung + -zusatz)

	II.A (N=6)	II.B (N=8)	p
Freies Glycerin	-2,72 $\pm$ 1,12	+2,53 $\pm$ 0,48	<0,01
Freie Fettsäuren	+5,06 $\pm$ 2,52	+0,71 $\pm$ 1,67	n.s.
Triglycerid-Glyc			
0'	0,020 $\pm$ 0,008	0,047 $\pm$ 0,011	n.s.
20'	0,034 $\pm$ 0,014	0,050 $\pm$ 0,013	n.s.
40'	0,061 $\pm$ 0,018	0,041 $\pm$ 0,008	n.s.
60'	0,085 $\pm$ 0,060	0,056 $\pm$ 0,010	n.s.

Freies Glycerin angegeben in $\mu\text{Mol} \times (30 \text{ g Muskel} \times \text{h})^{-1}$

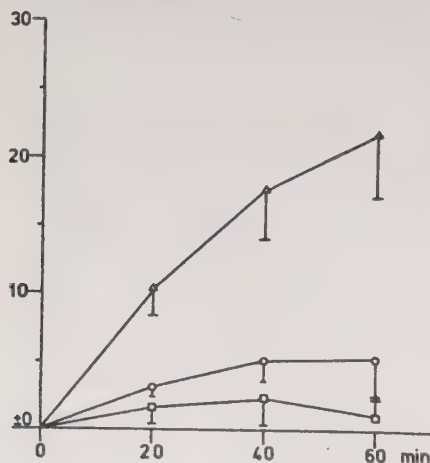
Freie Fettsäuren angegeben in $\mu\text{Val} \times (30 \text{ g Muskel} \times \text{h})^{-1}$

Triglycerid-Serumspiegel in $\mu\text{Mol} / \text{ml}$

Abb.: II.8

Produktion der Freien Fettsäuren durch den Muskel

$\mu\text{Mol Freie Fettsäuren}$
30 g Muskel



Signifikanz:

(60' - Kumulativ)

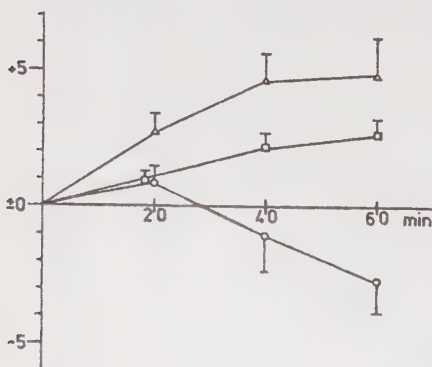
○-○ / □-□ n.s.
 △-△ / □-□ $p < 0,001$
 I.A / II.A $p < 0,005$

○-○ Insulinzusatz
 □-□ Insulinzusatz, Betamethasonzusatz
 und Betamethasonvorbehandlung
 △-△ Betamethasonzusatz und Betamethason-
 vorbehandlung

Abb.: II.9

Produktion und Aufnahme von Freiem Glycerin durch den Muskel

$\mu\text{Mol Freies Glycerin}$
30 g Muskel



Signifikanz:

(60' - Kumulative)

○-○ / □-□ $p < 0,01$
 △-△ / □-□ n.s.

○-○ Insulinzusatz
 □-□ Insulinzusatz, Betamethasonzusatz und
 Betamethasonvorbehandlung
 △-△ Betamethasonzusatz und Betamethason-
 vorbehandlung

g) Elektrolyte

Die Plasmakonzentrationen von Na^+ und Ca^{++} änderten sich im Verlauf der Perfusion nicht signifikant, während die K^+ - Bilanz unter Insulin eine K^+ -Aufnahme durch das Muskelpräparat belegte, so daß der K^+ -Gehalt des Mediums gegenüber dem Ausgangswert um etwa 9 % abgesunken war (Tab.: II.3).

Tab.: II.3

Elektrolytverhalten im Verlauf der Perfusion

	Na^+	K^+	Ca^{++}
II.A (N=6)			
0'	143,80 $\pm$ 7,4	5,12 $\pm$ 0,23	5,67 $\pm$ 0,24
60'	147,60 $\pm$ 4,1	4,81 $\pm$ 0,06	5,83 $\pm$ 0,17
II.B (N=8)			
0'	149,40 $\pm$ 2,6	5,29 $\pm$ 0,20	6,03 $\pm$ 0,16
60'	149,30 $\pm$ 2,9	4,55 $\pm$ 0,20	5,94 $\pm$ 0,12

Konzentrationsangaben in mVal / Ltr Mediumplasma

Signifikanz:

K^+ II.A 0' / 60' n.s.
II.B 0' / 60' $p < 0,001$

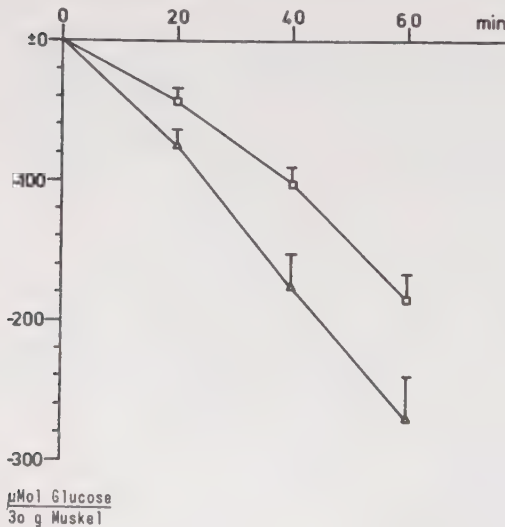
C) VERSUCHSGRUPPE III (Actinomycin-D)

a) Glucose

Eine Actinomycin-D Vorbehandlung der Versuchstiere mit 400 μg / Tier führte zu einer signifikanten Steigerung der Glucoseaufnahme gegenüber adrenaletomierten unbehandelten Tieren (+ 33,2 %). Bei Actinomycin-D Vorbehandlung mit nachfolgender Beta-methasongabe verminderte sich diese Glucoseaufnahme signifikant gegenüber den Aufnahmewerten der Reihe III.A. Actinomycin-D vermochte den Glucocorticoid-effekt auf das Glucoseverhalten somit nicht zu hemmen (Tab.: III.1, Abb.: III.1, III.2) .

Abb.: III.1

Glucoseaufnahme aus dem Medium



Signifikanz:
(60' - Kumulative)

□□ / △△ $p < 0,05$

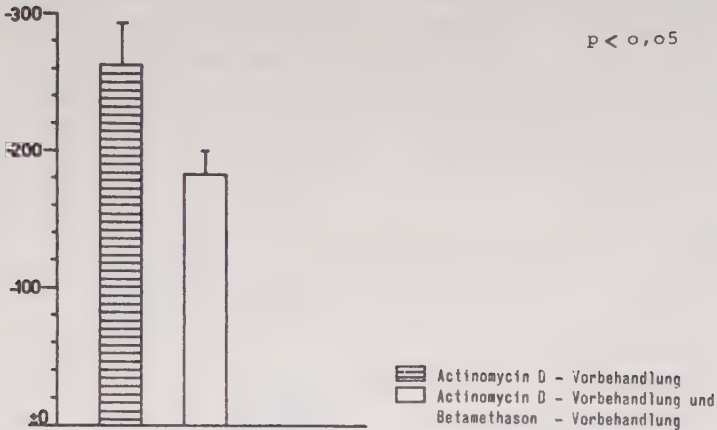
□□ Actinomycin D - Vorbehandlung und
Beta-methason - Vorbehandlung
△△ Actinomycin D - Vorbehandlung

Abb.: III.2

60' - Kumulative der Glucoseaufnahme durch den Muskel

$\frac{\mu\text{Mol Glucose}}{30 \text{ g Muskel} \cdot \text{h}}$

Signifikanz:



b) U - ^{14}C - Glucose-Oxidation

Dem vorgenanntem Befund entsprach das Ergebnis, daß die oxidative Durchsatzrate der radioaktiv markierten Glucose bei Actinomycin-D- und Betamethasonvorbehandlung der Tiere signifikant vermindert war gegenüber der $^{14}\text{CO}_2$ - Bildung in der Versuchsreihe mit alleiniger Actinomycin-D-Vorbehandlung (Tab.: III.2).

Tab.: III.2

Gesamt-dpm (60' - Kumulative) $\times (30 \text{ g Muskel} \times \text{h})^{-1}$
als Maß der $^{14}\text{CO}_2$ - Bildung

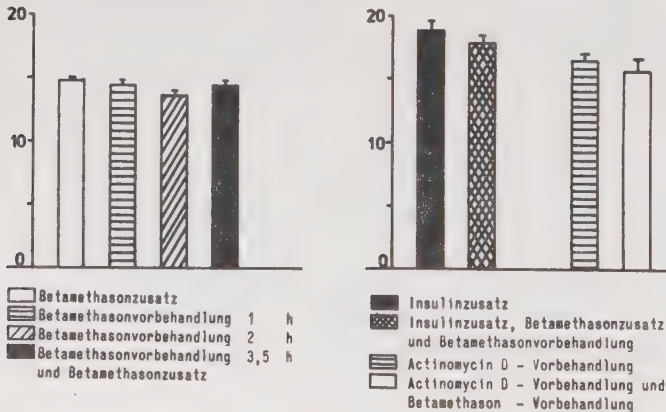
Versuchsreihe	Gesamt-dpm	
III.A (Actinomycin D - Vorbehandlung)	31 001 + 1 453	$p < 0,001$
III.B (Actinomycin-D- und Betamethasonvorbehandlung)	15 693 + 1 129	

c) Muskelglykogen

Im Muskelglykogengehalt war nach Actinomycin-D-Vorbehandlung nur in den Versuchen ein geringer Anstieg im Vergleich zu Kontrolltieren zu verzeichnen, in denen eine signifikante Glucoseaufnahmesteigerung erfolgte. Actinomycin-D- und Betamethasonvorbehandlung zog diese signifikante Änderung im Glykogengehalt des Musculus Gastrocnemius nicht nach sich (Tab.: III.1, Abb.: III.3).

Abb.: III.3

Muskelglykogengehalt des Musculus Gastrocnemius
nach 60' Perfusion



Werte angegeben als mg Glykogen x (g Trockengewicht)⁻¹

Signifikanz:

Betamethasonzusatz/Actinomycin-D-Vorbehandlung $p < 0,02$

Betamethasonzusatz/Actinomycin-D- und Betamethasonvorbehandlung n.s.

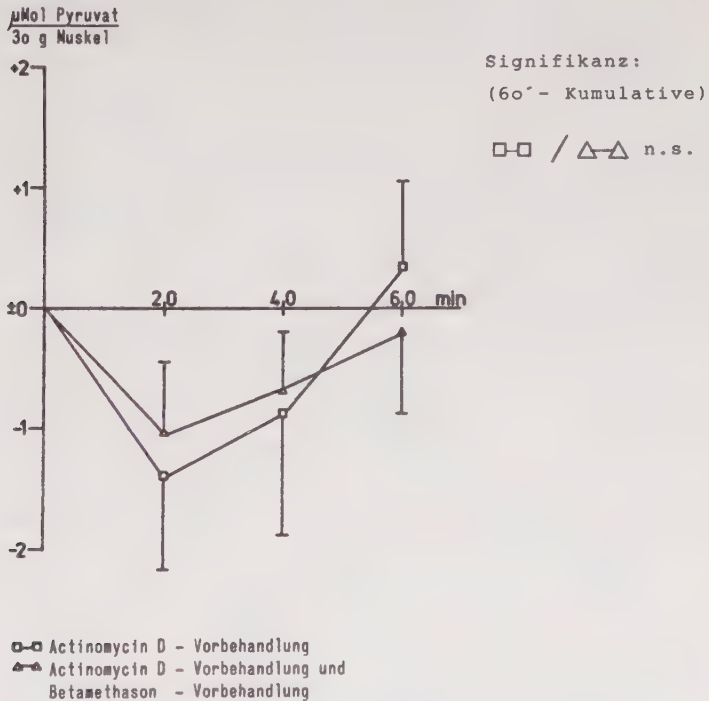
Actinomycin-D /Actinomycin-D- und Betamethasonvorbehandlung n.s.

d) Pyruvat

Während des Perfusionsverlaufes kam es nach anfänglicher geringer Pyruvatextraktion aus dem Medium zu einer verminderten Pyruvataufnahme bzw zu einer Pyruvatfreisetzung, die nach 20' Perfusionszeit einsetzte und bis zum Perfusionsabschluß anstieg (Tab.: III.1, Abb.: III.4) .

Abb.: III.4

Pyruvatverhalten während der Perfusion



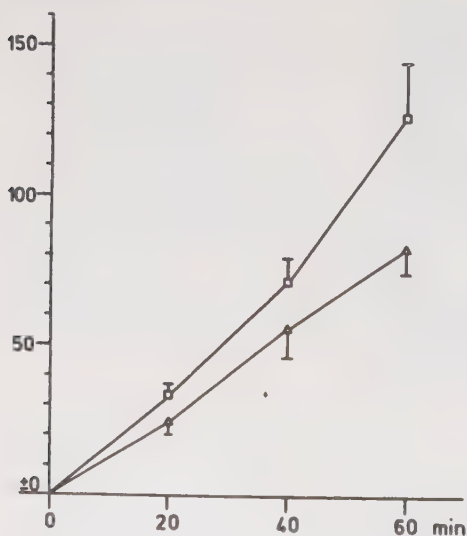
e) Laktat

Die Laktatproduktion zeigte in der Actinomycin-D-Kontrollreihe (III.A) entsprechend der stark gesteigerten Glucoseaufnahme einen steileren Anstieg im Vergleich zur Reihe III.B mit Betamethasongabe. Infolge einer relativ breiten Streuung der Einzelwerte zeigten die beiden Versuchsreihen keinen signifikanten Unterschied in der Laktatproduktion (Tab.: III.1, Abb.: III.5) .

Abb.: III.5

Laktatbildung durch den Muskel

$\mu\text{Mol Lactat}$
30 g Muskel



Signifikanz:
(60' - Kumulative)

$\square-\square$ / $\triangle-\triangle$ n.s.

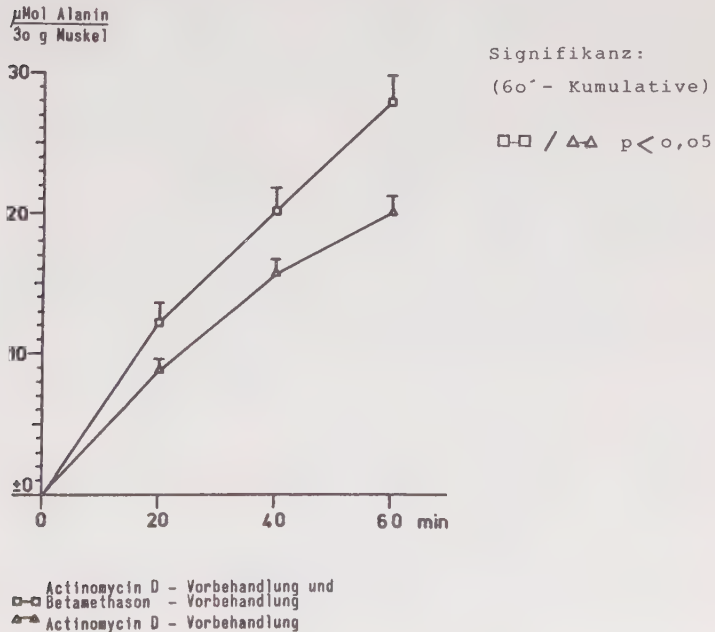
$\square-\square$ Actinomycin D - Vorbehandlung
 $\triangle-\triangle$ Actinomycin D - Vorbehandlung und
Betamethason - Vorbehandlung

f) Alanin

Die Actinomycin-D - Kontrollreihe (III.A) verzeichnete mit einem Wert von $19,98 \mu\text{Mol}$ ($60'$ - Kumulative) eine Alaninfreisetzungsrate, die im Bereich der Ergebnisse an Adrenalektomietieren liegt (vorausgegangene Ergebnisse des Institutes, 32). Eine Actinomycin-D-Vorbehandlung mit nachfolgender Beta-methasonapplikation führte zu einem 40 % igen Anstieg der Alaninfreisetzung, die so den Ergebnissen der ersten Versuchsreihen in der Versuchsgruppe I entsprach. Actinomycin-D vermochte auch in diesem Stoffwechselbereich die Glucocorticoidwirkungen nicht zu hemmen (Tab.: III.1, Abb.: III.6) .

Abb.: III.6

Alaninfreisetzung durch das Muskelpräparat



Tab.: III.1

VERSUCHSREIHE		S U B S T R A T E				
	N	Glucose	Pyruvat	Laktat	Alanin	Muskel glykogen
A Actinomycin-D - Vorbehandlung	6	- 263,31 + 29,45	+ 0,35 + 0,72	+ 126,06 + 18,01	+ 19,98 + 1,11	16,59 + 0,58
B Actinomycin-D - Vorbehandlung Betamethason-Vorbehandlung 3,5 h	6	- 183,40 + 18,32	- 0,21 + 0,72	+ 82,00 + 8,82	+ 27,99 + 1,91	15,66 + 0,99
p		< 0,05	n.s.	n.s.	< 0,05	n.s.

Glucose, Pyruvat, Laktat, Alanin sind angegeben als $\mu\text{Mol} \times (30 \text{ g Muskel} \times \text{h})^{-1}$

Muskelglykogen

ist angegeben als mg / g Trockengewicht

Ergebnisse

sind angegeben als $\bar{x} + s_{EM}$

g) Freies Glycerin, Freie Fettsäuren, Triglyceride

Eine Actinomycin-D-Gabe an die Versuchstiere hatte eine verminderte Produktionsrate von Freien Fettsäuren zur Folge, die auch unter Betamethasoneinfluß bestehen blieb (Tab.: III.2, Abb.: III.7). Die Ergebnisse in der Freisetzung von Freiem Glycerin entsprachen den Werten, die an unbehandelten Adrenalektomietieren beobachtet wurden (Tab.: III.2, Abb.: III.8). Die Serum-Triglyceridspiegel zeigten im Perfusionsverlauf keine signifikanten Änderungen (Tab.: III.2) .

Tab.: III.2

Verhalten von Freiem Glycerin, Freien Fettsäuren und Triglyceriden in den Versuchsreihen III.A und III.B

Versuchsreihe	III.A (N=6)	III.B (N=6)	p
Freies Glycerin	+ 3,90 ± 0,95	+ 3,38 ± 0,95	n.s.
Freie Fettsäuren	+ 10,41 ± 1,83	+ 7,17 ± 1,58	n.s.
Triglycerid-Glyc			
0"	0,047 ± 0,010	0,049 ± 0,009	n.s.
20"	0,064 ± 0,028	0,034 ± 0,008	n.s.
40"	0,078 ± 0,029	0,028 ± 0,004	n.s.
60"	0,062 ± 0,022	0,025 ± 0,007	n.s.

Freies Glycerin angegeben in $\mu\text{Mol} \times (30 \text{ g Muskel} \times \text{h})^{-1}$

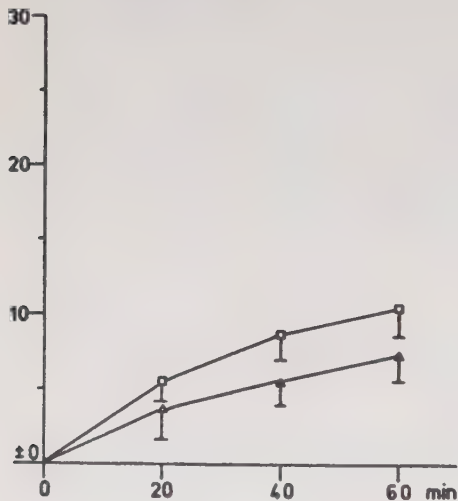
Freie Fettsäuren angegeben in $\mu\text{Val} \times (30 \text{ g Muskel} \times \text{h})^{-1}$

Triglyceridserumspiegel in $\mu\text{Mol} / \text{ml}$

Abb.: III.7

Produktion von Freien Fettsäuren

$\mu\text{Val Freie Fettsäuren}$
30 g Muskel



□-□ Actinomycin-D
- Vorbehandlung

△-△ Actinomycin-D
und Betamethason
- Vorbehandlung

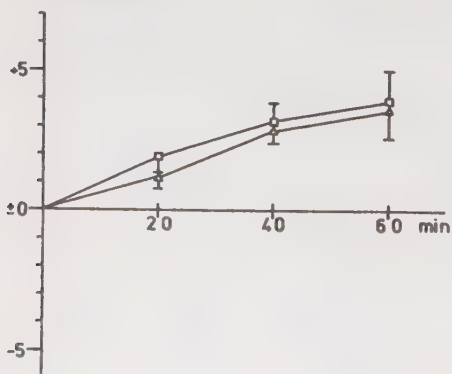
Signifikanz:
(60' - Kumulative)

□-□ / △-△ n.s.

Abb.: III.8

Freisetzung von Freiem Glycerin

$\mu\text{Mol Freies Glycerin}$
30 g Muskel



□-□ Actinomycin-D
- vorbehandlung

△-△ Actinomycin-D
und Betamethason
- Vorbehandlung

Signifikanz:
(60' - Kumulative)

□-□ / △-△ n.s.

h) Elektrolyte

Während des Perfusionsverlaufes entwickelten sich keine signifikanten Veränderungen in der Plasmaelektrolytkonzentration (Tab.: III.3). Da nur ein geringer K^+ - Anstieg zu verzeichnen war, ergab sich kein direkter Hinweis auf eine Zellmembranschädigung.

Tab.: III.3

Elektrolytverhalten während der Perfusion

VERSUCHSREIHE	Na^+	K^+	Ca^{++}
III.A (N=6)			
0'	152,00 ± 4,80	5,67 ± 0,19	6,06 ± 0,16
60'	155,70 ± 2,41	6,29 ± 0,28	6,00 ± 0,20
III.B (N=6)			
0'	147,20 ± 4,60	5,38 ± 0,21	6,00 ± 0,16
60'	145,90 ± 2,98	5,55 ± 0,04	5,85 ± 0,07

Konzentrationsangabe in mVal / Ltr Mediumplasma

Signifikanz: III.A K^+ 0' / 60' n.s.

D) KONTROLLPARAMETER ZUR BEURTEILUNG DER INTAKTHEIT
DES MUSKELPRÄPARATES

Als Beurteilungskriterien für die Intaktheit des Muskelpräparates während der Perfusion wurden folgende Parameter herangezogen: der Wassergehalt des Muskelgewebes, der arterielle pH-Wert, der arterielle pO_2 , die Mediumdurchflußrate (Tab.:IV), die oben beschriebenen Elektrolytkonzentrationen sowie letztlich die Hormonempfindlichkeit des Präparates.

Der Wassergehalt des Muskelgewebes wurde mit $\bar{x} = 74,99 \%$ (N=52) bestimmt. Dieser Wert korreliert gut mit früheren Ergebnissen, die sowohl bei in-vivo als auch bei in-vitro Messungen gewonnen wurden (32). Während der Perfusion kam es somit nicht zur Ausbildung eines Gewebeödems. Der arterielle pH-Wert blieb während des Versuchsablaufes im physiologischen Bereich, wobei die erhöhte Laktatbildung unter Insulin (Tab.: IV, II A/B) ein leichtes Absinken des pH-Wertes nach sich zog. Die geringe, nicht kritische Abnahme des arteriellen pO_2 findet ihre Erklärung in einer Teiläquilibration zwischen Carbogen-Gasgemisch im System und der Außenluft, die durch das Öffnen des Systems zur Probenentnahme ermöglicht wurde. Ein wichtiger Beurteilungsfaktor lag in der Kontrolle der Durchflußrate des Mediums durch das Muskelpräparat. Mit einem mittleren Wert von etwa $14 \text{ ml/min} \times 30 \text{ g Muskel}$ gewährleistete der Mediumdurchfluß eine ausreichende O_2 - Versorgung des Gewebes unter diesen Bedingungen. Die Energiereichen Phosphate liegen im Bereich der in-vivo Werte (32).

Tab.: IV

PERFUSIONSKONTROLLE

VERSUCHS-				pH art	pO ₂ art mm ² Hg	ml min x 30 g Muskel	Trockengew. in % des Feuchtgew.
GRUPPE/REIHE N			Zeit				
I.	A.	6	0°	7,406 ± 0,014	437,50 ± 7,34	15,68 ± 0,73	
			60°	7,347 ± 0,013	316,10 ± 37,80	15,05 ± 1,00	24,24 ± 0,56
	B.	6	0°	7,402 ± 0,013	448,90 ± 7,10	13,30 ± 0,90	
			60°	7,371 ± 0,019	360,90 ± 27,40	13,40 ± 1,00	24,85 ± 0,17
	C.	7	0°	7,388 ± 0,016	453,00 ± 11,90	13,90 ± 0,90	
			60°	7,377 ± 0,018	394,10 ± 22,50	12,50 ± 0,80	25,28 ± 0,67
	D.	7	0°	7,376 ± 0,020	438,60 ± 12,10	12,04 ± 0,61	
			60°	7,292 ± 0,046	342,70 ± 16,90	11,93 ± 0,54	25,60 ± 0,27
II.	A.	6	0°	7,335 ± 0,009	452,50 ± 9,80	12,85 ± 1,81	
			60°	7,256 ± 0,011	395,90 ± 16,80	12,23 ± 1,52	24,35 ± 0,90
	B.	8	0°	7,405 ± 0,014	405,20 ± 17,40	14,35 ± 0,66	
			60°	7,297 ± 0,017	307,00 ± 12,70	13,35 ± 0,60	25,56 ± 0,39
III.	A.	6	0°	7,404 ± 0,008	404,70 ± 10,50	16,15 ± 0,68	
			60°	7,328 ± 0,008	354,90 ± 37,30	14,40 ± 1,43	25,53 ± 0,56
	B.	6	0°	7,404 ± 0,017	426,50 ± 13,22	15,05 ± 1,01	
			60°	7,308 ± 0,010	305,50 ± 32,20	14,25 ± 0,66	24,63 ± 0,33

Werte angegeben in $\bar{x} \pm \text{EM}$

V. DISKUSSION

A) VERSUCHSGRUPPE I (zeitliche Entwicklung)

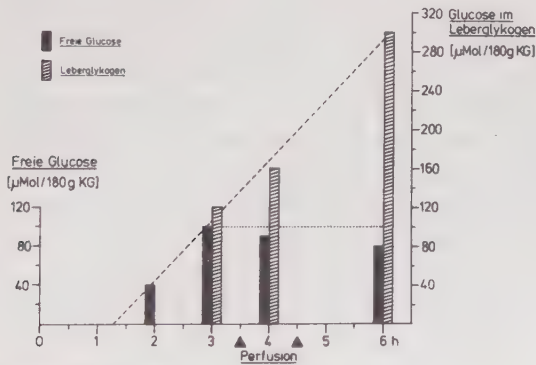
Da ein akuter Glucocorticoidzusatz zum Perfusionsmedium während der einstündigen Perfusionsphase keine steroidspezifischen Stoffwechselveränderungen im Vergleich zu adrenaletomierten Kontrolltieren (32) bewirkte, muß eine Verzögerungsphase bis zur Ausbildung dieser Effekte auf den Muskelmetabolismus angenommen werden. Dies wird deutlich in den qualitativen und quantitativen Veränderungen im Stoffwechselgeschehen, die im folgenden diskutiert werden.

Bereits 1940 führten die grundlegenden in-vivo Untersuchungen von Long et al (7) zu der Beobachtung, daß einer in-vivo Applikation von Glucocorticoiden ein Anstieg des Blutglucosespiegels folgte. Die Erklärung hierfür sahen Long et al in einer Stimulation des Proteinkatabolismus und einer nachfolgenden Gluconeogenese aus den anfallenden Proteinabbauprodukten. Weitere in-vivo Versuche dieser Arbeitsgruppe (29) zeigten, daß die Veränderungen in der Glucosehomöostase zwei Stunden nach Glucocorticoidgabe eintraten. Auch Munck und Koritz (12) fanden in ihren Versuchen an hungernden, adrenaletomierten Ratten nach achtzig bis hundert Minuten eine Hemmung der Glucoseaufnahme, führten dieses Phänomen jedoch nicht auf einen gesteigerten Proteinabbau und eine Gluconeogenese zurück, sondern auf eine periphere Glucoseutilisationshemmung. Diese Untersucher verneinten eine Direktwirkung der Glucocorticoide auf den Glucosestoffwechsel der Skelettmuskulatur und sahen einen Glucosestau des Muskelgewebes als Folge primärer glucocorticoidbedingter

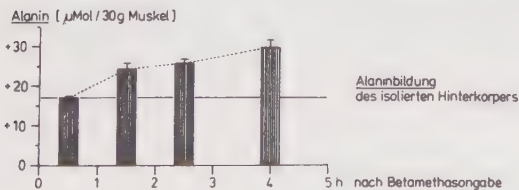
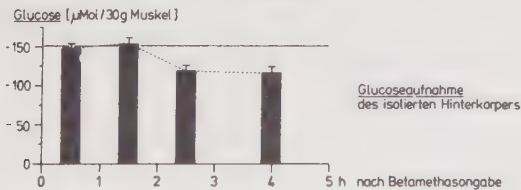
kataboler Prozesse in anderen Geweben, zum Beispiel im Fettgewebe an (10-12). Im Gegensatz hierzu belegen die gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen eine nach Glucocorticoidbehandlung eintretende und für die in-vivo Situation relevante Glucoseaufnahmehemmung in der Muskulatur. In Übereinstimmung mit den von Long et al (29) gemachten in-vivo Beobachtungen (Abb.: V.1) trat diese Änderung im Glucosegleichgewicht bei in-vitro Untersuchungen nach zweistündiger Glucocorticoidvorbehandlung auf.

Abb.: V.1

Glucosebereitstellung nach Cortisolgabe an adrenalectomierte Ratten



Werte von Long et al (29) modifiziert auf $\mu\text{Mol}/180\text{g Körpergewicht}$



Obwohl die Glucoseaufnahme als gering, jedoch signifikant vermindert anzusehen ist, so muß sich die Änderung unter Berücksichtigung des Masseanteils der Muskulatur am Ganztier doch auf die Glucosehomöostase des Gesamtorganismus auswirken, so daß es infolge der Glucoseeinsparung in der Muskulatur zu einer deutlichen Verschiebung des Glucosepools in das Leberglykogen kommt (32). Eine Verminderung der Glucoseaufnahme nach Glucocorticoiden wurde bereits in anderen peripheren Geweben nachgewiesen (1,2,10,12), jedoch blieb das zugrundeliegende Wirkungsprinzip bis jetzt ungeklärt. Munck fordert in seinem Modell für Lymphozyten ein glucocorticoidinduziertes Protein als auslösenden Faktor einer nachfolgenden Glucoseaufnahmehemmung (33).

Der Glucosestoffwechsel des Muskelpräparates wird sicherlich auch durch den Ernährungszustand der adrenalectomierten Versuchstiere beeinflusst. Infolge der vierundzwanzigstündigen Hungerperiode sowie der vorausgegangenen Adrenalectomie kommt es zu einem Absinken des basalen Plasmainsulinspiegels (1,44,83) und damit zu einer Betonung der glucocorticoidbedingten Stoffwechselveränderungen. Diese hormonelle Lage muß sich auf den Glucosemembrantransport, die Glykogensynthese und auf die Glucosephosphorylierung auswirken.

Die Tatsache, daß sich die Glykogendeposition in der Skelettmuskulatur von einer Glucocorticoidapplikation in dem beobachteten Zeitraum unbeeinflusst zeigt, korreliert gut mit Befunden anderer Autoren (7,29). Kurzzeiteffekte der Glucocorticoide auf den Muskelglykogenstoffwechsel sind somit nicht nachzuweisen.

Die nach einstündiger in-vivo Vorbehandlung auftretende Verminderung der Pyruvatextraktion aus dem Medium und damit ein letztlich sichtbarer Glucosestau im Medium, der sich nach zwei Stunden signifikant manifestiert, weisen auf eine verminderte Einschleusung von exogenem oder glucoseabstammigem Pyruvat in den oxydativen Endabbau hin, möglicherweise infolge einer glucocorticoidbedingten Beeinflussung der Pyruvatdehydrogenase (2,5,85). Der Zustrom von Kohlenstoffskeletten aus dem Aminosäurenabbau in den intrazellulären Pyruvat-Pool muß als beeinflussender Faktor des Pyruvatverhaltens in Betracht gezogen werden (50,59). Obwohl die Glucoseoxydation gehemmt ist, wurde jedoch keine Abnahme des O_2 - Verbrauches (32) und keine Verminderung der Bereitstellung energiereicher Phosphate (32,39) beobachtet, so daß der Einstrom anderer Stoffwechselprodukte in den Citratzyklus zur Energiegewinnung gefordert werden muß. Ein infolge antianaboler und kataboler Glucocorticoidwirkung vermehrter Anfall und Abbau von Aminosäuren aus Muskelproteinen läßt eine Einschleusung von Aminosäureskeletten in den Citratzyklus, ihre Oxydation oder Überführung in Pyruvat zu, wobei freiwerdende NH_3 - Äquivalente zur Transaminierung von anfallendem Pyruvat dienen, das dann in Form von Alanin als wichtiger Gluconeogenesevorläufer der Leber zugeführt werden kann. Eine dem Pyruvatanfall nicht entsprechend rasche Bereitstellung einer ausreichenden Anzahl von NH_3 - Äquivalenten könnte über eine Verminderung der Transaminierungsrate zu der beobachteten verringerten Pyruvatextraktion führen, so daß als limitierender Faktor nicht die Pyruvatbereitstellung aus Glucose (59), sondern der NH_3 - Zustrom aus dem Aminosäurenkatabolismus anzusehen ist. Für diese Hypothese spricht

die zeitliche Übereinstimmung im Auftreten des Pyruvatstaus und des Sichtbarwerdens der vermehrten Alaninfreisetzung, das jeweils nach einstündiger in-vivo Vorbehandlung verifiziert wurde.

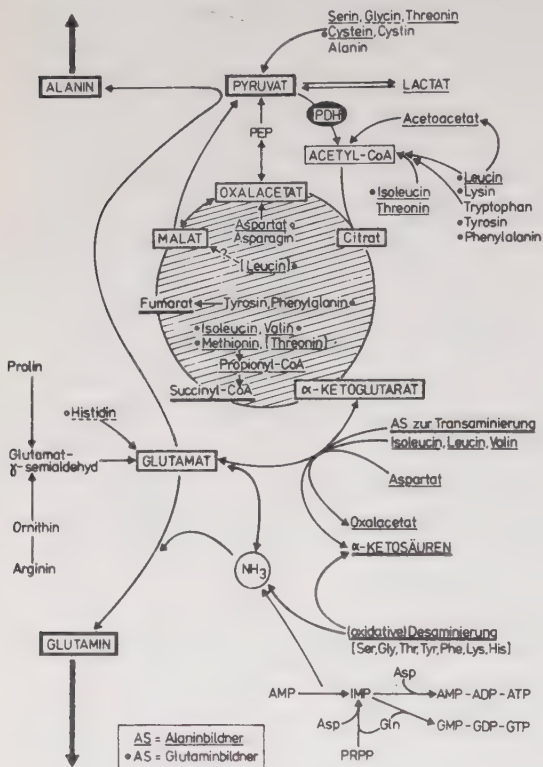
Das Laktatverhalten zeigte nach einstündiger Vorbehandlung eine gering signifikante Zunahme der Laktatproduktion. Da zu diesem Zeitpunkt ein Pyruvatstau bereits festzustellen war, eine rückwirkende Beeinflussung der Glucoseutilisation jedoch erst nach zwei Stunden auftrat, kann die Erklärung für dieses Laktatverhalten in einer Reduktion von anfallendem Pyruvat gesehen werden, da $\text{NADH} + \text{H}^+$ - Äquivalente aus einer noch nicht gehemmten Glykolyse bereitgestellt werden konnten. Nach zwei bzw. dreieinhalb Stunden war keine gesteigerte Laktatproduktion mehr nachweisbar. Da hier die Glucoseaufnahmehemmung und auch eine Glykolysehemmung zur Ausprägung kamen, verhinderte ein in der Folge auftretendes Absinken der cytoplasmatischen $\text{NADH} + \text{H}^+$ Bereitstellung eine weitere gesteigerte Pyruvatreduktion zum Laktat.

Die frühe Glucocorticoidbeeinflussung des Proteinstoffwechsels äußerte sich bereits nach einstündiger Vorbehandlung in einem hochsignifikanten Anstieg der Alaninfreisetzung. Da der Alaningehalt der Muskelproteine weniger als 10 % der Aminosäuren beträgt und kein polyalanylhaltiges Protein in der Muskulatur nachgewiesen wurde (45,49-51), muß die gesteigerte Alaninabgabe nicht allein als Ergebnis eines verstärkten Proteinkatabolismus, sondern auch als Folge einer de novo Alaninsynthese angesehen werden (45,56).

Diese erfolgt in einer Transaminierungsreaktion von bereitgestelltem Pyruvat. Über Ursprung, quantitative Aspekte und Signifikanz dieser Kohlenstoffskelette bzw. des neugebildeten Alanins finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. Odessy et al (56) bezifferten die Menge des aus dem Glucoseabbau stammenden Pyruvats bzw. Alanins mit 30 % der gesamten, von gefütterten Tieren freigesetzten Alaninfraktion, bei hungernden Tieren sogar mit 60 %. In einer anderen Untersuchung an gefütterten Ratten betrug die de novo Alaninsynthese aus glucoseabstammigem Pyruvat 33 % des freigesetzten Alanins (62). Da der Anteil des nicht glucoseabstammenden Alanins an der Gesamtalaninfreisetzung etwa 15 % betragen soll (62) und dieser Prozentsatz nicht allein durch eine Proteolyse erklärt werden kann, muß eine de novo Alaninsynthese auch aus Aminosäurenabbauprodukten gefordert werden (55,59). Die nicht gesteigerte Alaninbildung aus markierter Glucose nach Glucocorticoidbehandlung, wie sie in früheren Versuchen des Institutes belegt wurde, stützt diese Hypothese (32). Weil die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Thienhaus et al (63) eine gesteigerte Alaninfreisetzung infolge vermehrten Proteinkatabolismus bzw gehemmter Proteinsynthese nach Glucocorticoiden belegen, da sich weiterhin eine Glucoseaufnahmehemmung und eine trotz konstantem Pyruvatdruck verminderte Pyruvatextraktion aus dem Medium findet, scheint hier der Aminosäurenabbau zu einer wichtigen Pyruvatquelle zu werden, begleitet von einer verstärkten NH_3 - Bereitstellung (47,56), da es im Rahmen des Proteinkatabolismus auch zu einer vermehrten Oxydation von verzweigtkettigen Aminosäuren als wichtigen NH_3 - Donatoren kommt. Einschleusung von Pyruvat und NH_3 - Äquivalenten aus dem Aminosäurenabbau führt somit zu einer Beeinflussung der de novo Alaninsynthese.

Abb.: V.2

Übersicht über den Intermediärstoffwechsel verschiedener Aminosäuren



Diese Ergebnisse und die zeitlich frühe Umstellung in der Alaninbildung stützen die These einer primären wichtigen Glucocorticoidwirkung auf den Proteinstoffwechsel der Muskulatur, wie es bereits Long et al (7,8) gefordert haben. Die Klärung der Frage, inwieweit unter Glucocorticoidenfluß verstärkt Kohlenstoffskelette aus dem muskulären Aminosäurenabbau über Acetyl-CoA oder Intermediärprodukte des Citratzyklus in den oxydativen

Endabbau und über eine de novo Alaninsynthese in die Lebergluconeogenese eingeschleust werden, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Dabei bliebe zu ermitteln, ob infolge des oben genannten Abbaus eine Hemmung der PDH und eine Beeinflussung von Glykolyse-enzymen (z.B. Phosphofructokinase) durch erhöhte Acetyl-CoA- oder aufrechterhaltene intrazelluläre Citratspiegel auftritt.

Eine Aktivitätsminderung der Pyruvatkinase durch Alanin, wie sie in der Leber (25) und in der Niere (52) nachgewiesen wurde, wurde in der Muskulatur nicht festgestellt (49).

Der von Randle et al (76) in Versuchen an Rattenherzen postulierte Glucose-Fettsäuren-Zyklus konnte von anderen Autoren für das isolierte Rattendiaphragma und den ruhenden peripheren Muskel nicht bestätigt werden (71,77). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen können eine vermehrte Fettsäurenfreisetzung und -oxydation, sowie eine rückwirkende Beeinflussung des Glucosestoffwechsels in der peripheren Muskulatur insofern nicht bestätigen, da keine frühzeitige verstärkte Lipolyse nach Glucocorticoiden auftrat. Hier findet sich eine Übereinstimmung mit entsprechenden Befunden am Ganztier (2,70), während andere Autoren im Fettgewebe verstärkte Freisetzungen von Freien Fettsäuren nach Glucocorticoidapplikation gesehen haben (5,38,86,87). Da sich eine vermehrte Oxydation unveresterter Fettsäuren für die Aufrechterhaltung der Energiebereitstellung aus unseren Befunden nicht ableiten läßt, erfährt die Hypothese einer Einschleusung von Aminosäurenabbauprodukten in den oxydativen Endabbau eine Bekräftigung.

B) VERSUCHSGRUPPE II (Insulineinfluß)

Die in den vorliegenden Untersuchungen nach Insulingabe beobachtete Steigerung der muskulären Glucoseaufnahme um den Faktor 2,5 korreliert gut mit Befunden, die Thienhaus et al (63) sowie andere Autoren (62,68,71) am Hinterkörperpräparat erhoben haben. In Übereinstimmung mit Ergebnissen am inkubierten Musculus Soleus (40) konnte eine Glucocorticoidgabe diesen Insulineffekt nicht mindern. Auch im Fettgewebe wurde eine glucocorticoid-beeinflußte Insulinwirkung auf die Glucoseaufnahme von Fain et al (38) nicht nachgewiesen. Die insulinbedingte Glucoseaufnahmesteigerung und der verstärkte Glucose-transport (67) fanden ihre Äußerung in einer erhöhten Muskelglykogendeposition sowie in einer gesteigerten Glykolyse, die sich in vermehrter Laktat- und Pyruvatproduktion manifestierte. Trotz des vermehrt anfallenden Pyruvats bewirkte die Steroidapplikation keine weitere Steigerung der Gesamttalaninfreisetzung gegenüber insulinfrei perfundierten Präparaten, vielmehr ließ sich eine rückläufige Tendenz in der Alaninsynthese feststellen. Diese Ergebnisse lassen einen hemmenden Einfluß auf die antianabolen bzw. katabolen Glucocorticoidwirkungen durch Insulin vermuten, entsprechend des anabolen Insulineffektes, der von mehreren Untersuchern belegt ist (63,66). Das Alaninverhalten nach Insulingabe wird jedoch von verschiedenen Autoren nicht einheitlich beurteilt. Während einige Untersuchungen keine insulinbedingte Beeinflussung der peripheren Alaninfreisetzung sichern konnten (45,48,58,60), sprachen andere Versuchsergebnisse für eine Verminderung der Alaninproduktion nach Insulingabe (62,63,66,67,71).

Felig und Wahren (48) sahen nach Insulin eine verminderte periphere Mobilisation von verzweigtkettigen Aminosäuren, für Alanin jedoch forderten sie eine Minderung der hepatischen Extraktion, jedoch keine Abnahme der peripheren Alaninfreisetzung. Thienhaus et al (63) fanden dagegen eine unter Insulineinfluß verminderte Freisetzung aller Aminosäuren. Jefferson et al (66) dokumentierten eine insulinbedingte Abnahme der Basalfreisetzung von Alanin, Prolin, Phenylalanin, Glutamin, Lysin, Glycin, Threonin, Arginin und Asparagin. Für Leucin, Isoleucin und Valin sowie Serin sicherte diese Arbeitsgruppe sogar eine Nettoaufnahme durch den Muskel. Auch Reimer et al (71) belegten für den isoliert perfundierten Hinterkörper eine Abnahme der Alaninbasalfreisetzung nach Insulin.

Die vorgenannten Ergebnisse unterstützen die Vorstellung eines konkurrierenden, antagonistischen Einflusses von Insulin und Glucocorticoiden auf den Proteinstoffwechsel. Anaboler Effekt einerseits äußert sich in verminderter Aminosäurenfreisetzung und -oxydation, kataboler bzw. antianaboler Einfluß andererseits bewirkt vermehrte Aminosäurenfreisetzung und verstärkte Oxydation. Eine beidseitige Einflußnahme auf das Ribosomenverhalten kann hier in Betracht gezogen werden, eine Ribosomenstrukturveränderung (16), die eine Störung der Proteininitiation nach sich zieht. Bullock et al (14) und Young et al (15) beschrieben unter Glucocorticoiden einfluß eine Verminderung des Polysomengehaltes der Skelettmuskulatur, während Jefferson et al (66) unter Insulin einfluß eine Zunahme des Polysomengehaltes mit entsprechender Abnahme des Anteils der Ribosomen-Untereinheiten feststellten.

Die insulinbedingte Aufrechterhaltung bzw. Verstärkung der Glucoseaufnahme und der Glykolyse führte über eine vermehrte Bereitstellung von L-Glycerin-3-Phosphat und eine geförderte Reveresterung zu einer Verminderung in der Freisetzung von Fettsäuren (67,71). Die Aufhebung der Lipolyse unter diesen Bedingungen äußerte sich während der Perfusion in der fehlenden Glycerinfreisetzung. Bei alleinigem Insulinzusatz ließ sich eine Aufnahme von Glycerin aus dem Medium beobachten (81), unter Insulin und Glucocorticoid eine jedoch nur geringe Verminderung der Glycerinfreisetzung. Dies soll als Hinweis auf eine mögliche Glycerinverwertung durch den Muskel aufgefaßt werden, zumal das Vorhandensein einer Glycerokinaseaktivität in der Muskulatur beschrieben ist (88,89). Eine endgültige Klärung dieses Ergebnisses muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

C) VERSUCHSGRUPPE III (Actinomycin-D-Einfluß)

Bei den Untersuchungen zur Hypothese einer möglichen glucocorticoidbedingten peripheren Enzyminduktion als Ursache für Stoffwechselveränderungen nach Glucocorticoidapplikation verwendeten einige Autoren den Transscriptionsblocker Actinomycin-D. Schoner et al (25) fanden nach einer Dosis von 400 µg / Tier eine Hemmung der cortisolbedingten peripheren Substratliberation, dabei lag die erforderliche Dosis doppelt so hoch wie die Menge, die zur Unterdrückung von Leberenzyminduktionsprozessen notwendig war.

Munck et al (33,34) wählten eine Konzentration von $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ Zellsuspension Lymphozyten; bei diesen Untersuchungen fand sich eine Hemmung der Cortisolwirkung bei gleichzeitigem Zusatz von Steroid und Actinomycin-D, bzw. bei Zusatz von Actinomycin-D vor der Cortisolgabe. Eine spätere Applikation nach der Cortisolgabe hatte keinen hemmenden Einfluß auf die Steroidwirkungen. Diese Ergebnisse deuteten Munck et al im Sinne einer cortisolbedingten Induktion eines Proteins, das eine Glucoseaufnahmehemmung bewirkt. Im Gegensatz hierzu belegten Untersuchungen von Fain und Czech (90) an Fettzellen, daß eine Applikation von Actinomycin-D eine Stunde nach Cortisolgabe noch eine teilweise Unterdrückung der Steroidwirkung zur Folge hat. So fanden sich verschiedene widersprüchliche Ergebnisse über Actinomycin-D Effekte. Neben einer Hemmung der mRNA-Synthese beschrieben Schwartz et al (92) an der Retina auch unspezifische Actinomycin-D Effekte, ATP - Abfall, Absinken des O_2 - Verbrauches und Zellstrukturveränderungen, so daß sie eine generelle Zell- und Stoffwechselgiftwirkung angenommen haben.

Bei unseren Untersuchungen zeigten sich ebenfalls Actinomycin-D Effekte als deutliche Nebenwirkungen auf Glucosestoffwechsel und Laktatbildung, die an eine unspezifische Beeinflussung des Zellstoffwechsels denken lassen müssen. Der Mechanismus der "Zelltoxizität" blieb im Unklaren. Obwohl die Actinomycin-D Vorbehandlung vor der Glucocorticoidgabe erfolgte, vermochte sie die glucocorticoidspezifischen Stoffwechseleränderungen in der Muskulatur nicht zu unterdrücken: die typische Glucoseaufnahmehemmung und der erhöhte Alaninspiegel waren auch unter diesen Bedingungen zu beobachten.

Der nicht aufgehobene Hormoneffekt auf den Glucose-metabolismus zeigte sich auch in der verminderten Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$, die für eine verringerte Glucoseoxydation spricht. Die verminderte Laktatfreisetzung nach Betamethason ist als Ausdruck der eingeschränkten Glykolyse und $\text{NADH} + \text{H}^+$ - Bereitstellung zu werten.

Die Wirkungen des Actinomycin-D, wie Munck et al (33) sie für Thymuszellen beobachteten, konnten somit für die Muskulatur nicht nachgewiesen werden. Dieser Befund spricht gegen die Hypothese einer glucocorticoid-bedingten Enzyminduktion in der Muskulatur als Ursache der peripheren Wirkungen, zumal der einstündige Zeitraum von der Glucocorticoidapplikation bis zum Auftreten der ersten sichtbaren Effekte für einen Induktionsprozeß sehr knapp bemessen wäre.

VI.

ZUSAMMENFASSUNG

Am isoliert perfundierten Hinterkörper der Ratte wurde die zeitliche Entwicklung der Glucocorticoidwirkungen in der Muskulatur sowie deren Beeinflussung durch Insulin und Actinomycin-D untersucht.

Ein Betamethasonzusatz zum Medium zeigte innerhalb einer Stunde keine glucocorticoidspezifischen Wirkungen auf das Stoffwechselgeschehen. Eine Stunde nach in-vivo Applikation des Glucocorticoids war am Muskelpräparat eine Steigerung der Alaninfreisetzung sowie eine Verminderung der Pyruvatextraktion aus dem Medium zu verzeichnen. Nach zweistündiger Vorbehandlung manifestierte sich eine Glucoseaufnahmehemmung. Eine signifikante Beeinflussung der Fettsäurenfreisetzung sowie des Glycerinverhaltens wurde nicht beobachtet.

Insulingabe bewirkte eine zweieinhalbfache Steigerung der Glucoseaufnahme, eine vermehrte Pyruvat- und Laktatbildung, eine Steigerung der Glykogensynthese; die Alaninproduktion des Präparates zeigte einen Trend zur Verminderung. Die Freisetzung von unveresterten Fettsäuren wurde vermindert. Unter Glucocorticoiden dominierten die Insulineffekte auf das Stoffwechselgeschehen und hoben spezifische Glucocorticoidwirkungen auf.

Eine Actinomycin-D Vorbehandlung der Versuchstiere, die vor der Glucocorticoidapplikation erfolgte, konnte in der Muskulatur die Glucocorticoideffekte auf den Metabolismus nicht unterdrücken.

VII.

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Wolfgang Staib danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für das Interesse, das er den Perfusionsversuchen entgegenbrachte.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Martin Schwenen für seine freundliche Unterstützung bei der Einführung in das Arbeitsgebiet, bei der Durchführung der Tieroperationen, sowie bei den Substratbestimmungen. Seine Anregungen bei der Versuchsdurchführung und seine Ratschläge bei der Niederschrift der Arbeit bedeuteten mir eine große Hilfe.

Frau Grete Hannemann danke ich für ihren steten und gewissenhaften Einsatz und ihre Hilfsbereitschaft.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. R.Steele: Influences of corticosteroids on protein and carbohydrate metabolism. Handbook of Physiology (Geiger, ed.) Sect 7, Vol 6: Adrenal Gland, Washington D.C., Am Physiol Society, (1975) p 135
2. B.R.Landau: Adrenal steroids and carbohydrate metabolism. Vitamins and Hormones 23 : 2, (1965) p 1
3. E.B.Thompson, M.E.Lippmann: Mechanism of action of glucocorticoids. Metabolism 23 : 2 (1974) p 159
4. J.D.Baxter, P.H.Forsham: Tissue effects of glucocorticoids. Am J Med, 53 (1972) p 573
5. B.Jeanrenaud, A.E.Renold: Metabolic effects of corticosteroids. Handbuch des Diabetes 1, S. 591
6. E.R.Ramey: Corticosteroids and skeletal muscle. Handbook of Physiology, Sect 7, Vol 6 (1975) p 245
7. C.N.H.Long, B.Katzin, E.G.Fry: The adrenal cortex and carbohydrate metabolism. Endocrinology, 26 (1940) p 309
8. C.N.H.Long: A discussion of the mechanism of adrenal cortical hormones on carbohydrate and protein metabolism. Endocrinology, 30 (1942) p 870
9. A.Eisenstein: Effects of adrenal cortical hormones on carbohydrate, protein and fat metabolism. Am J Clin Nutr, 26 (1973) p 113
10. A.Munck: Glucocorticoid inhibition of glucose uptake by peripheral tissues; old and new evidence, molecular mechanism and physiological significance. Persp Biol Med, 14 (1971) p 265
11. K.Leung, A.Munck: Peripheral actions of glucocorticoids. An Rev Physiol, (1975) p 245
12. A.Munck, S.B.Koritz: Early effects of cortisol on blood glucose and on glucose entry into muscle, liver and adipose tissue. Biochim Biophys Acta, 57 (1962) p 310
13. J.Hanoune, A.M.Chambaut, A.Josipowicz: The glucose effect and cortisone upon rat liver and muscle protein metabolism. Arch Biochim Biophys, 148 (1972) p 180

14. G.R.Bullock, E.E.Carter, P.Elliott, R.F.Peters, P.Simpson, A.M.White: Relative changes in the function of muscle ribosomes and mitochondria during the early phase of steroid induced catabolism. *Biochem J*, 127 (1972) p 881
15. V.R.Young, S.C.Chen, J.MacDonald: The sedimentation of rat muscle ribosomes. *Biochem J*, 106 (1968) p 913
16. I.G.Wool, J.J.Castles, D.P.Leader, A.Fox: Insulin and function of muscle ribosomes. *Handbook of Physiology*, Sect 7, Vol 1, chapter 24 (1972) p 385
17. M.Mayer, Fr.Rosen: Glucocorticoid receptors in skeletal muscle. *Isr J Med Sci*, 11 (1975) p 699
18. H.J.Hübener: Über den Mechanismus der Gluconeogenese nach oraler Cortisolgabe. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, Bd 322 (1960) p 135
19. D.Degenhardt, H.J.Hübener, I.Alester: Über den Wirkungsmechanismus der Glucocorticoide. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, Bd 323 (1961) p 278
20. W.Ewald, H.J.Hübener, E.Wiedemann: Weitere Untersuchungen über die Enzyminduktion durch Cortisol in der Leber. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, Bd 333 (1963) p 57
21. B.D.Ross, R.Hems, H.A.Krebs: The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver. *Biochem J*, 102 (1967) p 942
22. H.G.Meiers, K.H.Rudorff, G.Albaum, W.Staib: Wirkungen von Cortisol an der isoliert perfundierten Rattenleber. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, Bd 348 (1967) p 944
23. L.E.Malette, J.H.Exton, C.R.Park: Control of gluconeogenesis from amino acids in the perfused rat liver. *J Biol Chem*, 244 (1969) p 5713
24. K.H.Rudorff, H.Kröner, R.Windeck, W.Staib: Über den Einfluß von Insulin und Betamethason auf die Gluconeogenese aus Alanin und Pyruvat in der isoliert perfundierten Leber adrenaletomierter Ratten. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, Bd 351 (1970) p 1064
25. W.Schoner, U.Haag, W.Seubert: Regulation of carbohydrate metabolism by cortisol independent of the de novo synthesis of enzymes in rat liver. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, Bd 351 (1970) p 1071
26. P.D.Ray, D.O.Foster, H.A.Lardy: Mode of action of glucocorticoids. *J Biol Chem*, 239 (1964) p 3396

27. T.Dieterich: Der Wirkungsmechanismus des Cortisols auf die Gluconeogenese. Diss med Universität Düsseldorf (1966)
28. M.Schwenen: Gluconeogenese aus extrahepatischen Substraten. Diss med Universität Düsseldorf (1970)
29. C.N.H.Long zitiert bei B.R.Landau: Adrenal steroids and carbohydrate metabolism. Vitamins and Hormones 23 : 2 (1965) p 2
30. Y.Morita,A.Munck: Effect of glucocorticoids in vivo and in vitro on net glucose uptake and amino acid incorporation by rat thymus cells. Biochim Biophys Acta, 93 (1964) p 150
31. J.N.Livingstone,D.H.Lockwood: Effect of glucocorticoids on the glucose transport system of isolated fat cells. J Biol Chem, 250 (1975) p 8353
32. N.Kühn-Velten: Regulationsmechanismen am insulinfrei perfundierten Hinterkörper der Ratte. Diss med Universität Düsseldorf (1977)
33. A.Munck,D.A.Young: Corticosteroids and lymphoid tissue. Handbook of Physiology, Sect 7, chapter 16 (1975) p 231
34. K.M.Mosher,D.A.Young,A.Munck: Evidence for irreversible Actinomycin-D sensitive and temperature sensitive steps following binding of cortisol to glucocorticoid receptors and preceding effects on glucose metabolism in rat thymus cells. J Biol Chem, 246:3 (1971) p 654
35. C.Hallahan,D.A.Young,A.Munck: Time course of early events in the action of glucocorticoids on rat thymus cells in vitro. J Biol Chem, 248:8 (1973) p 2922
36. D.R.Drury: Control of blood sugar. J Clin Endocr 2 (1942) p 421
37. D.J.Ingle: Problems relating to the adrenal cortex. Endocrinology, 31 (1942) p 419
38. J.N.Fain,R.O.Scow,S.S.Chernick: Effects of glucocorticoids on metabolism of adipose tissue in vitro. J Biol Chem, 238 (1963) p 54
39. H.Kröner,W.Staib: Cortisolwirkungen auf den Protein- und Energiestoffwechsel in der Peripherie. Acta Endocrinologica 59 (1968) p 193

40. I.H.Chaudry, N.S.Adzick, M.M.Sayeed, A.E.Baue: Effect of hydrocortison and dexamethason on xylose uptake by isolated rat soleus muscle.
Biochim Biophys Acta, 399 (1975) p 85
41. M.S.Herman, E.R.Ramey: Effect of hydrocortison and epinephrine on glucose uptake by the rat diaphragm.
Endocrinology, 67 (1960) p 650
42. D.M.Kipnis: Regulation of glucose uptake by muscle, functional significance of permeability and phosphorylating activity. Ann N Y Acad Sci, 82 (1959) p 354
43. C.R.Park, H.E.Morgan: Glucose transport and phosphorylation in muscle of diabetic animals.
Diabetes, 9 (1960) p 250
44. J.H.Exton: Gluconeogenesis.
Metabolism, 21 : 10 (1972) p 945
45. P.Felig, J.Wahren: Protein turnover and amino acid metabolism in the regulation of gluconeogenesis.
Fed Proc, Vol 33 : 4 (1974) p 1092
46. P.Felig, J.Wahren: Amino acid metabolism in exercising man. J Clin Invest, 50 (1971) p 2703
47. N.B.Rudermann: Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis. Ann Rev Med, 26 (1975) p 245
48. P.Felig: Interaction of insulin and amino acid metabolism in the regulation of gluconeogenesis.
Isr J Med Sci, 8 (1972) p 262
49. P.Felig: The glucose-alanine-cyclus.
Metabolism, 22:2 (1973) p 179
50. P.Felig, Th.Pzefsky, E.Marliss, G.F.Cahill jr: Alanine: key role in gluconeogenesis.
Science, Vol 167 (1970) p 1003
51. D.R.Kominz, A.Hough, P.Symonds, K.Laki: The amino acid composition of actin, myosin, tropomyosin and the meromyosin. Arch Biochem Biophys, 50 (1954) p 148
52. D.Friedrichs, W.Schoner: Regulation of gluconeogenesis by alanine. Biochim Biophys Acta, 343 (1974) p 341
53. M.MacDonald, N.Neufeldt, B.N.Park, M.Berger, N.Rudermann: Alanine metabolism and gluconeogenesis in the rat.
Am J Physiol, 231 (1976) p 619

54. E.Ishikawa,T.Aikawa,H.Matsutaka: The role of alanine and serine in hepatic gluconeogenesis.
J Biochem, 71 (1972) p 1093
55. E.Ishikawa,T.Aikawa,H.Matsutaka: The roles of alanine as a major precursor among amino acids for hepatic gluconeogenesis and as a major end product of the degradation of amino acids in rat tissues.
J Biochem, 71 (1972) p 1097
56. R.Odessy,E.A.Khairallah,A.L.Goldberger: Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle. J Biol Chem, 249:23 (1974) p 7623
57. N.B.Rudermann,M.Berger: The formation of glutamine and alanine in skeletal muscle.
J Biol Chem, 249:17 (1974) p 5500
58. A.J.Garber,I.E.Karl,D.M.Kipnis: Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle I.
J Biol Chem, 251 (1976) p 826
59. A.J.Garber,I.E.Karl,D.M.Kipnis: Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle II.
J Biol Chem, 251 (1976) p 836
60. A.J.Garber,I.E.Karl,D.M.Kipnis: Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle III.
J Biol Chem, 251 (1976) p 844
61. A.J.Garber,I.E.Karl,D.M.Kipnis: Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle IV.
J Biol Chem, 251 (1976) p 851
62. B.Grubb: De novo synthesis of alanine by the perfused rat hindlimb. Am J Phys, 230:5 (1976) p 1379
63. R.Thienhaus,L.Tharandt,U.Zais,W.Staib: Einfluß von Glucocorticoiden auf die Freisetzung von Aminosäuren des perfundierten Hinterkörpers adrenaletomierter Ratten. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem, Bd 356 (1975) p 811
64. I.G.Wool,E.J.Weinshelbaum: Incorporation of ¹⁴C-amino acids into protein of isolated diaphragm; role of the adrenal steroids. Am J Phys, 197 (1959) p 1089
65. J.J.Betheil,M.Feigelson,P.Feigelson: The differential effects of glucocorticoids on tissue and plasma amino acid levels. Biochim Biophys Acta, 104 (1965) p 92
66. L.S.Jefferson,D.E.Rannels,B.L.Munger,H.E.Morgan: Insulin in the regulation of protein turnover in heart and skeletal muscle. Fed Proc, 33:4 (1974) p 1098

67. P.J.Randle: The mechanism of action of insulin: effects of insulin on muscle tissue.
Handbuch des Diabetes, 1 (Pfeiffer, ed.) (1969) p 477
68. P.Strohfeldt, H.Kettl, K.F.Weinges: Perfusion of the isolated rat hindlimb with a semisynthetic medium.
Hormone Metab Res, 6 (1974) p 167
69. B.Friedmann, E.H.Goodman jr, S.Weinhouse: Effects of insulin and fatty acids on gluconeogenesis in the rat.
J Biol Chem, 242 :16 (1967) p 3620
70. J.Herrmann, W.Staib: Beziehung zwischen Lipolyse, Gluconeogenese und Insulinsekretion nach Cortisolgabe an Ratten. European J Biochem, 7 (1969) p 427
71. F.Reimer, G.Löffler, G.Hennig, O.H.Wieland: The influence of insulin on glucose and fatty acid metabolism in the isolated perfused rat hind quarter.
Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem, Bd 356 (1975) p 1055
72. M.Berger, S.Hagg, N.B.Rudermann: Glucose metabolism in perfused skeletal muscle; interaction of insulin and exercise on glucose uptake. Biochem J, 146 (1975) p 231
73. D.M.Kipnis, M.W.Noall: Stimulation of amino acid transport by insulin in the isolated rat diaphragm.
Biochim Biophys Acta, 28 (1958) p 226
74. R.M.Fulks, J.Li, A.Goldberg: Effects of insulin, glucose and amino acids on protein turnover in rat diaphragm.
J Biol Chem, 250 (1975) p 290
75. D.M.Daniel, E.R.Love, O.E.Pratt: The effect of insulin upon the movement of glucose into skeletal muscle of the rat in vivo. Proc J Physiol, 239 (1974) p 90 P
76. P.J.Randle, E.A.Newsholme, P.B.Garland: Regulation of glucose uptake by muscle (8). Biochem J, 93 (1964) p 652
77. D.Schonfeld, D.M.Kipnis: Effects of fatty acids on carbohydrate and fatty acid metabolism of rat diaphragm.
Am J Phys, 215 (1968) p 513
78. P.B.Garland, E.A.Newsholme, P.J.Randle: Regulation of glucose uptake by muscle (9). Biochem J, 93 (1964) p 665
79. P.J.Randle, P.B.Garland, C.N.Hales, E.A.Newsholme, R.M.Denton, C.I.Pogson: Interactions of metabolism and physiological role of insulin. Recent Progr Hormone Res, 22 (1966) p 1

80. G.I.Drummond: Muscle metabolism.
Fortschr Zool, 18 (1967) S.359
81. N.B.Rudermann,C.R.S.Houghton,R.Hems:
Evaluation of the isolated perfused rat hind quarter
for the study of muscle metabolism.
Biochem J, 124 (1971) p 639
82. L.S.Jefferson: A technique for perfusion of an isolated
preparation of rat hemicorpus. Methods in Enzymology
39 (1975) New York: Academic Press, p 73
83. D.J.Millward,D.O.Nnanyelugo,W.P.T.James,P.J.Garlick
Protein metabolism in skeletal muscle, the effect of
feeding and fasting on muscle RNA, free amino acids
and plasma insulin concentrations.
Br J Nutr, 32 (1974) p 127
84. R.F.Peters,M.C.Richardson,M.Small,A.M.White: Some bio-
chemical effects of triamcinolon acetonide on rat liver
and muscle. Biochem J, 116 (1970) p 349
85. E.M.Glenn,B.J.Bowmann,R.B.Bayer,C.E.Meyer: Hydrocort-
ison and some of its effects on intermediary metabolism.
Endocrinology, 68 (1961) p 381
86. B.Jeanraud,A.E.Renold: Studies on rat adipose tissue
in vitro III; effect of adrenal cortical hormones.
J Biol Chem, 235 (1960) p 2217
87. B.Leboeuf,A.E.Renold,G.F.Cahill jr: Studies on rat
adipose tissue in vitro IV; further effects of cortisol
on glucose metabolism. J Biol Chem, 237 (1962) p 988
88. J.Robinson,E.A.Newsholme: Glycerol kinase activities
in rat heart and adipose tissue.
Biochem J, 104 (1967) 2 c
89. L.Hagenfeldt,J.Wahren: Uptake, release and oxidation
of individual FFA and glycerol.
Scand J Clin Lab Invest, 18 (1968) p 263
90. M.P.Czech,J.N.Fain: Dactinomycin inhibition of dexa-
methason action on glucose metabolism in white fat cells.
Biochim Biophys Acta, 230 (1971) p 185
91. R.K.Conlee,M.J.Rennie,W.W.Winder: Skeletal muscle
glykogen content. Am J Phys, 231 (1976) p 614
92. R.J.Schwartz: Control of glutamin synthetase synthesis
in the embryonal chick neural retina.
J Biol Chem, 248 (1973) p 6426

93. H.Schimassek: Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isoliert perfundierten Rattenleber.
Biochem Z, 336 (1963) p 460
94. W.Werner, H.G.Rey, H.Wielinger:
Z Analyt Chem, 252 (1970) S. 244
95. R.Czok, W.Lamprecht: in Methoden der enzymatischen Analyse (H.U.Bergmeyer und Hrsg.) 3.Auflage, Bd 2 (1974) Weinheim: Verlag Chemie, S. 1492
96. I.Gutmann, A.W.Wahlefeld: in Methoden der enzymatischen Analyse (H.U.Bergmeyer und Hrsg.) 3.Auflage, Bd 2 (1974) Weinheim: Verlag Chemie, S. 1510
97. D.H.Williamson: in Methoden der enzymatischen Analyse (H.U.Bergmeyer und Hrsg.) 3.Auflage, Bd 2 (1974) Weinheim: Verlag Chemie, S. 1724
98. S.Seifter, S.Dyton, B.Novic, E.Muntwyler: The estimation of glycogen with the anthrone reagent.
Arch Biochem, 25 (1950) p 191
99. W.G.Duncombe: The colorimetric micro determination of long chain fatty acids. Biochem J, 88 (1963) p 7
100. M.Eggstein, E.Kuhlmann: in Methoden der enzymatischen Analyse (H.U.Bergmeyer und Hrsg.) 3.Auflage, Bd 2 (1974) Weinheim: Verlag Chemie, S. 1871
101. Documenta Geigy
Wissenschaftliche Tabellen, 7.Auflage, S.383

LEBENS LAUF

Am 8. April 1951 wurde ich als Sohn des Maurers Herbert Staschok und seiner Ehefrau Marga, geb. Kremmers, in Dhünn im Rhein-Wupper-Kreis geboren.

Von April 1958 bis zum Oktober 1961 besuchte ich die evangelische Volksschule 4 in Krefeld, von Oktober 1961 bis April 1962 die evangelische Volksschule Rheydt-Odenkirchen. Anschließend wechselte ich auf den altsprachlich-humanistischen Zweig des Gymnasiums Rheydt-Odenkirchen über, an dem ich zum 1. Juni 1970 die Reifeprüfung ablegte.

Vom 1. Juli 1970 bis zum Beginn meines Medizinstudiums im April 1972 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr ab. Zum Sommersemester 1972 nahm ich an der Universität Düsseldorf das Medizinstudium auf. Dort bestand ich am 28. Februar 1973 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 2. August 1974 die ärztliche Vorprüfung.

Meine klinische Ausbildung setzte ich an der Universität Düsseldorf fort und leistete von Oktober 1977 bis September 1978 das Praktische Jahr am Akademischen Lehrkrankenhaus in Neuss, Lukas-Krankenhaus, ab.

Im November 1978 bestand ich die ärztliche Prüfung.

